



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**NOVOS DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS
DUAIS COM ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA**

Recife

2022

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**NOVOS DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS
DUAIS COM ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco na área de concentração Fármacos e Medicamentos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Co-orientadores: Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Recife

2022

Catalogação na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

R175n Ramos, Katharina Rodrigues de Lima Porto.
Novos derivados *N*-acilhidrazônicos como potenciais fármacos duais com atividades anti-inflamatória e antimicrobiana / Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos. – 2022.
130 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Teresinha Gonçalves da Silva.
Coorientadora : Vanda Lúcia dos Santos.
Coorientador : Ricardo Olímpio de Moura.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Inflamação. 2. *N*-acilhidrazonas. 3. Inflamação Pulmonar. 4. COVID-19. 5. Anti-Infeciosos. 6. Bomba de Efluxo. I. Silva, Teresinha Gonçalves da (Orientadora). II. Santos, Vanda Lúcia dos (Coorientadora). III. Moura, Ricardo Olímpio de (Coorientador). IV. Título.

615

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2023-044)

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**NOVOS DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS
DUAIS COM ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco na área de concentração Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 10 de outubro de 2022.

Banca examinadora:

Profa. Teresinha Gonçalves da Silva (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

A minha família, projeto de Deus...
Especialmente aos meus filhos Maria Beatriz e Mateus Felipe
A mais pura forma de amor...

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e toda glória, pela benção da vida concedida a cada amanhecer e por me fortalecer e abençoar na realização de mais um sonho. Gratidão!

Ao meu esposo, Felipe e aos meus filhos, Maria Beatriz e Mateus Felipe por toda compreensão apoio e incentivo na realização dessa conquista.

Aos meus pais, Ranulfo e Piedade e irmãos Karola e Ranulfo Filho pelo apoio e incentivo de sempre. Especialmente minha mãe que é minha fonte de inspiração, de força e garra, obrigada por todo entusiasmo nessa conquista.

A minha orientadora e mãe científica, Prof. Dra. Teresinha Gonçalves. Por todos os ensinamentos e orientações acadêmicas e principalmente seu apoio, amizade e escuta. Sua história é linda e inspiradora. Muito obrigada!

À Prof. Dra. Vanda Lúcia dos Santos, do Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual da Paraíba, por todo apoio, dedicação e amizade de sempre!

As “migles doctor”! Jéssica Andrade, Rayane Siqueira, Marília Grasielly, Wilma Raianny e Camila Joyce. Vocês foram inspiração, coragem, estímulo, ajuda, escuta, diversão e alegria durante esse tempo. Uns anjos da guarda em minha vida de doutoranda.

A querida Dra. Elizabeth Borba, por todo apoio, dedicação e atenção. Sua dedicação e amor pela pesquisa são inspiração.

Aos amigos do Biofarmatox, por toda prestatividade, que dividiram comigo momentos de aflição e descontração e contribuíram para consolidação deste trabalho. Especialmente Alessandra Martins, George Tôrres, José Rivaldo, Gênesis Medeiros, Giselly Silva, Stella Lourenço e Maria Rodrigues foi maravilhoso conviver com todos vocês.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos / UFPE, especialmente aos queridos amigos do LAMAI, Pérsio Alexandre, Érick Jhones e Prof. Dra. Norma Buarque de Gusmão, por toda ajuda sempre que necessário para minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura do Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual da Paraíba, por fornecer as moléculas de estudo deste trabalho.

Ao professor Mário Ribeiro de Melo Júnior do Centro de Ciências Médicas/UFPE e a amiga Silvania Tavares Paz pela contribuição experimental e intelectual.

A Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino da Universidade Regional do Cariri pela contribuição intelectual, por toda ajuda e atenção.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações, especialmente a Rilvan e Nerilin. Muito obrigada!

A Universidade Estadual da Paraíba, instituição que sou servidora, por me conceder o afastamento de minhas atividades para dedicação a essa conquista.

A Universidade Federal de Pernambuco por oferecer um programa de pós-graduação e disponibilizar os espaços para a realização da minha pesquisa e obtenção do título de doutor.

Muito obrigada, Deus abençoe cada um de vocês!

***“Fiz a escalada da montanha da vida
removendo pedras e plantando flores” (CORALINA, 1965, 32)***

RESUMO

Os derivados *N*-acilhidrazônicos são estruturas amplamente utilizadas na química medicinal devido à sua facilidade de síntese e por exibirem um amplo leque de atividades farmacológicas descritas na literatura. O objetivo da pesquisa foi avaliar o possível efeito dual de derivados *N*-acilhidrazônicos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 como anti-inflamatórios e antimicrobianos. A atividade antimicrobiana foi testada frente a microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos, leveduras e isolados clínicos. A atividade citotóxica foi avaliada em células normais e a atividade anti-inflamatória foi avaliada em modelo animal de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Na avaliação da atividade antimicrobiana, os resultados obtidos para bactérias e leveduras para a Concentração Inibitória Mínima variaram de 250 e 150 µg/mL, respectivamente, Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima variaram de 500 e 250 µg/mL, respectivamente. Na avaliação da inibição da bomba de efluxo, os derivados JR-15 e JR-18 apresentaram resultados sugestivos como inibidores de bomba de efluxo para as cepas testadas, sendo o JR-15 para a NorA e Tet(k) e o JR-18 para NorA e MsrA. Os derivados não apresentaram alterações sugestivas de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Na atividade anti-inflamatória *in vitro* houve inibição da produção de NO e baixa produção de IL-18 e TNF-α. No modelo da LPA, os derivados JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 reduziram a migração celular com porcentagem de inibição da inflamação de 62,8%; 40,9%; 83,2% e 86,9%, respectivamente, em relação ao controle. Os derivados também reduziram as concentrações de NO no lavado broncoalveolar e atividade da MPO e MDA no tecido pulmonar. O efeito anti-inflamatório foi confirmado através das análises histológicas do tecido pulmonar e na análise imuno-histoquímica foi observado a diminuição da reatividade para os marcadores COX-2 e iNOS. Os derivados JR17 e JR18 diminuíram os níveis das citocinas inflamatórias IL-6, IL-18 e TNF-α e aumentaram os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Conclui-se que os derivados JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas testadas e atenuaram a indução de várias características patogênicas importantes da LPA induzida pelo LPS, sugerindo uma ação dual como anti-inflamatórios e antimicrobianos, e como baixa toxicidade, especialmente o JR-18.

Palavras-chaves: inflamação; *N*-acilhidrazonas; inflamação pulmonar; COVID-19; antimicrobianos; bomba de efluxo.

ABSTRACT

N-acylhydrazonic derivatives are structures widely used in medicinal chemistry due to their ease of synthesis and because they exhibit a wide range of pharmacological activities described in the literature. The objective of the research was to evaluate the possible dual effect of *N*-acylhydrazonic derivatives JR-13, JR-15, JR-17 and JR-18 as anti-inflammatory and antimicrobial. The antimicrobial activity was tested against Gram-positive and Gram-negative microorganisms, yeasts and clinical isolates. The cytotoxic activity was evaluated in normal cells and the anti-inflammatory activity was evaluated in an animal model of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). In the evaluation of antimicrobial activity, the results obtained for bacteria and yeasts for the Minimum Inhibitory Concentration ranged from 250 and 150 µg/mL, respectively, Minimum Bactericidal Concentration and Minimum Fungicide Concentration ranged from 500 and 250 µg/mL, respectively. In the evaluation of the efflux pump inhibition, the derivatives JR-15 and JR-18 showed suggestive results as efflux pump inhibitors for the strains tested, being the JR-15 for NorA and Tet(k) and the JR-18 for NorA and MsrA. The derivatives did not show changes suggestive of toxicity in vitro and in vivo. In the in vitro anti-inflammatory activity there was inhibition of NO production and low production of IL-18 and TNF-α. In the ALI model, derivatives JR-13, JR-15, JR-17 and JR-18 reduced cell migration with inflammation inhibition percentage of 62.8%; 40.9%; 83.2% and 86.9%, respectively, in relation to the control. Derivatives also reduced NO concentrations in bronchoalveolar lavage and MPO and MDA activity in lung tissue. The anti-inflammatory effect was confirmed through histological analyzes of the lung tissue and in the immunohistochemical analysis a decrease in reactivity for the COX-2 and iNOS markers was observed. Derivatives JR17 and JR18 decreased the levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-18 and TNF-α and increased levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. It is concluded that the derivatives JR-13, JR-15, JR-17 and JR-18 showed antimicrobial activity for the tested strains and attenuated the induction of several important pathogenic characteristics of LPS-induced ALI, suggesting a dual action as anti-inflammatory and antimicrobial agents, and as low toxicity, especially JR-18.

Keywords: inflammation; *N*-acylhydrazones; lung inflammation; COVID-19; antimicrobials; efflux pump.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via sintética básica para a preparação de N-acilhidrazonas	22
Figura 2 - Componentes da resposta inflamatória aguda e crônica e suas principais funções.....	34
Figura 3 - Metabólitos do ácido araquidônico e eicosanoides.	36
Figura 4 - Esquema mostrando o alvéolo normal e o alvéolo lesionado.	45
Figura 5 - Esquema do mecanismo de resistência bacteriana Bomba de efluxo e a sua inibição.	48
Figura 6 - Esquema mostrando o mecanismo de atuação do LPS.	51
Figura 7 - Estrutura química dos derivados N-acilhidrazônicos JR-12 e JR-09Bz	54
Figura 8 - Esquema do experimento de LPA por LPS	66
Figura 9 - Fluxograma com o delineamento da pesquisa.	70
Figura 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas bacterianas.....	71
Figura 11 - Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas bacterianas.	72
Figura 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas de leveduras.....	73
Figura 13 - Concentração fungicida mínima (CFM) em µg/mL dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas de leveduras.....	74
Figura 14 - Avaliação do perfil antibacteriano dos derivados N-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 frente as cepas de <i>S. aureus</i> SA-1199 e SA-1199B em comparação com o controle de antibiótico Norfloxacin.	75
Figura 15 - Avaliação do perfil antibacteriano dos derivados N-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 frente as cepas de <i>S. aureus</i> RN4220 e IS-58 em comparação com os controles antibióticos Eritromicina e Tetraciclina, respectivamente.	76
Figura 16 - Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelos	

derivados N-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com Norfloxacin, frente as cepas de <i>S. aureus</i> SA-1199 e SA-1199B.	77
Figura 17 - Avaliação da capacidade de inibição das bombas de efluxo MsrA e Tet(K) pelos derivados N-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com Eritromicina e Tetraciclina, frente as cepas de <i>S. aureus</i> RN4220 (A) e IS-58 (B).	78
Figura 18- Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados N-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com brometo de etídio, frente as cepas de <i>S. aureus</i> SA-1199 e SA-1199B. ..	79
Figura 19 - Avaliação da capacidade de inibição das bombas de efluxo MsrA e Tet(K) pelos derivados N-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com brometo de etídio, frente as cepas de <i>S. aureus</i> RN4220 (A) e IS-58 (B).	80
Figura 20 - Efeito hemolítico dos derivados N-acilhidrazônicos na membrana dos eritrócitos de camundongos.	82
Figura 21 - Percentual de viabilidade celular dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 em fibroblastos murino (L929) após 72 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.	83
Figura 22 - Percentual de viabilidade celular dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 em macrófagos murino (J774) após 72 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.	84
Figura 23 - Percentual de viabilidade celular dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 em macrófagos peritoneais induzidos por Tioglicolato em camundongos Swiss após 24 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.	85
Figura 24 - Quantificação indireta de NO pelos níveis de nitrato/nitrito no lavado celular de macrófagos murino estimulados com LPS e tratados com os derivados N-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18), dexametasona e L-NAME.	86
Figura 25 - Níveis de citocinas IL-18 e TNF- α no lavado celular de macrófagos murino estimulados com LPS e após tratamento com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 e dexametasona.	87
Figura 26 – Fotomicrografia pulmonar de camundongos BALB/c submetidos à indução	

de lesão aguda por LPS e tratados com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona com a Coloração Tricomico de Masson. Escala 1 µm. Aumento de 100x.	96
Figura 27 - Análise imuno-histoquímica da Ciclooxigenase-2 (COX-2) no modelo de lesão pulmonar induzida por LPS.	98
Figura 28 - Análise imuno-histoquímica da Sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) no modelo de lesão pulmonar induzida por LPS.....	99
Figura 29 - Quantificação indireta de NO pelos níveis de nitrato/nitrito no LBA dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona.	100
Figura 30 - Níveis de MPO tecidual nos pulmões dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona.....	102
Figura 31 - Níveis de TBARS no tecido pulmonar dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona.....	104
Figura 32 - Níveis de Citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF-α no tecido pulmonar dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-17 e JR-18 e dexametasona.....	106
Figura 33 - Fluxograma com a evolução da pesquisa.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos selecionados para a revisão de literatura acerca das <i>N</i> -acilhidrazonas com atividade anti-inflamatória	24
Tabela 2 - Novos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos	55
Tabela 3 - Efeito do tratamento agudo dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg, sobre o consumo de ração, o consumo de água e o ganho de massa corporal de camundongos fêmeas por 14 dias de observação	89
Tabela 4 - Efeito do tratamento agudo dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg, sobre o peso médio (g) dos órgãos de camundongos fêmeas por 14 dias de observação	89
Tabela 5 - Efeito do tratamento agudo dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg, sobre os parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas por 14 dias de observação	87
Tabela 6 - Efeito dos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 (300 mg/kg) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas	91
Tabela 7 - Total de leucócitos polimorfonucleares e percentual de inibição da migração celular no lavado broncoalveolar dos animais com LPA induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona	93
Tabela 8 - Total de leucócitos polimorfonucleares e contagem diferencial no lavado broncoalveolar dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados <i>N</i> -acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AECC	Conferência de Consenso Americano-Europeu
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroides
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosina-5'-Trifosfato
CCCP	Cianeto de Carbonila m-Clorofenil-Hidrazona
COX	Ciclo-oxigenase
CPMZ	Clorpromazina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
eNOS	NOS endotelial
EtBr	Brometo de Etídio
FC	Fibrose Cística
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-18	Interleucina-18
iNOS	NOS induzível
iPDE4	Inibidores da PDE4
L-Arg	L-Arginina
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo

LTA	Ácido Lipoteicóico
LTs	Leucotrienos
mCD14	CD14 ligado à membrana
MDA	Malondialdeído
MMP-9	Metaloproteinase 9 da matriz
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Resposta Primária da Diferenciação Mielóide 88
NAH	<i>N</i> -acilhidrazonas
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	Factor Nuclear kappa β
NH ₂	Grupo Amino Livre
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOSs	Óxido Nítrico Sintases
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDE4	Fosfodiesterase 4
PGs	Prostaglandinas
PLA2c	Fosfolipase Citosólica A2
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
sCD14	CD4 solúvel
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido tiobarbitúrico
TLR-4	Receptor Toll-like
TNF-α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TRIF	Interferon-β Indutor de Adaptador com Domínio TIR
TXs	Tromboxanos
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ACILHIDRAZONAS	22
3.1.1	Acilhidrazonas com atividade anti-inflamatória	23
3.2	INFLAMAÇÃO	33
3.2.1	Fisiopatologia da Inflamação	33
3.2.2	Mediadores do Processo Inflamatório	35
3.2.2.1	Óxido Nítrico	38
3.2.2.2	Mieloperoxidase	39
3.2.2.3	Malondialdeído (MDA)	40
3.2.2.4	Citocinas	40
3.2.3	Resposta Imune e Inflamação	43
3.3	LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA) E A SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA)	43
3.3.1	Epidemiologia e fisiopatologia da LPA/SDRA	43
3.3.2	Lesão Pulmonar Aguda, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo e COVID-19	46
3.3.3	Antimicrobianos na LPA/SDRA e multiresistência	47
3.3.4	Modelo de Lesão Pulmonar Aguda Induzida por Lipopolissacarídeos (LPS)	50
3.3.5	Terapia da LPA/SDRA	52
4	MÉTODOS	54
4.1	OBTENÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS SUBSTITUÍDOS	54
4.1.1	Novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos	54
4.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	55
4.2.1	Atividade Antimicrobiana	55
4.2.1.1	Microrganismos	56

4.2.1.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	56
4.2.1.3	Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio.	57
4.2.2	Atividade Hemolítica	58
4.2.3	Citotoxicidade	59
4.2.3.1	Linhagens celulares e cultivo.....	59
4.2.3.2	Ensaio com Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliação de citotoxicidade.....	60
4.2.4	Atividade anti-inflamatório em macrófagos murinos	61
4.2.4.1	Dosagem de óxido nítrico e quantificação de citocinas em macrófagos murinos	61
4.3	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	62
4.3.1	Animais	62
4.3.2	Ensaio Toxicológico Não Clínico	63
4.3.3	Lesão Pulmonar Aguda por LPS	64
4.3.3.1	Desenho experimental.....	65
4.3.3.2	Contagem de Células do Lavado Broncoalveolar	66
4.3.3.4	Histologia do pulmão	67
4.3.3.5	Imunohistoquímica	67
4.3.3.6	Determinação dos níveis de Mieloperoxidase (MPO)	68
4.3.3.7	Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)	68
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4.5	DELINEAMENTO DA PESQUISA	69
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	71
5.1.1	Atividade Antimicrobiana	71
5.1.1.2	Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio.	75
5.1.2	Atividade Hemolítica	81
5.1.3	Citotoxicidade	82
5.1.4	Atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos	86
5.2	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	88
5.2.1	Ensaio Toxicológico Não Clínico	88

5.2.2	Lesão pulmonar aguda por LPS	92
5.2.2.1	Contagem de células do lavado broncoalveolar	92
5.2.2.2	Histologia	95
5.2.2.3	Imunohistoquímica	97
5.2.2.4	Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)	100
5.2.2.5	Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)	101
5.2.2.6	Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)	103
5.2.2.7	Dosagem de citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α	105
6	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO A – Comitê de ética em uso animal	129
	ANEXO B – Artigo publicado	130

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é considerada uma característica importante e onipresente nas doenças respiratórias das vias aéreas, como a lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), doenças vasculares e sepse (BOCHAROV *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2017). A inflamação pulmonar ocorre em resposta a patógenos bacterianos, virais, metazoários e fungos, além de poluentes ambientais. No pulmão, a inflamação aguda desregulada pode resultar em lesão que contribui para fibrose pulmonar e prejudica gravemente os processos de troca de gases essenciais, e se não resolvida, pode progredir para inflamação crônica, que ocorre em doenças pulmonares, como LPA/SDRA, asma, fibrose cística (FC) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (ROBB *et al.*, 2016).

A LPA e sua forma mais grave, a SDRA, continuam sendo problemas clínicos críticos observados em unidades de terapia intensiva em todo o mundo. Embora muitos avanços significativos tenham sido feitos em relação à estratégia terapêutica e ao entendimento da fisiologia respiratória associada, essas doenças ainda possuem alta morbidade e mortalidade em pacientes críticos, como os que estão em Unidades de Terapia Intensiva e que apresentam comorbidades (BOCHAROV *et al.*, 2016). Na atualidade, é evidente que a resistência aos antibióticos é um dos principais problemas de saúde, com forte impacto clínico e econômico. Patógenos que apresentam resistência a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos, definidos como multirresistentes, tornaram-se comuns, especialmente no ambiente hospitalar, para as quais há uma demanda urgente por novos tratamentos (TERRENI; TACCANI; PREGNOLATO, 2021).

As abordagens terapêuticas utilizadas atualmente para o tratamento da inflamação são focadas na supressão, bloqueio ou inibição de mediadores inflamatórios. Dentre estas terapias, destacam-se os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), que são fármacos que inibem a ciclo-oxigenase (COX), consequentemente bloqueiam a formação de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas. Nos últimos anos, a segurança na utilização dos AINEs na prática clínica tem sido questionada, tendo em vista seus efeitos colaterais com uso contínuo, especialmente dos inibidores seletivos da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), o que levou à remoção de alguns fármacos do mercado (MUSOLINO *et al.*, 2017). E os corticosteroides podem ser prejudiciais nos estágios iniciais da infecção (WONG *et al.*, 2020).

Os derivados *N*-acilhidrazônicos apresentam grupos farmacofóricos importantes que os tornam candidatos a fármacos com atividade anti-inflamatória, com toxicidade mínima e capaz de atuar como subunidade funcional em diferentes classes farmacêuticas. Por isso, tem despertado o interesse de muitos pesquisadores (GUEDES *et al.*, 2016), (YAMAZAKI *et al.*, 2021). Essas substâncias, que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona, têm sido relatadas na literatura como inibidores da COX e 5-lipoxigenase (5-LOX), esses achados direcionam para uma via terapêutica e o desenvolvimento de derivados biologicamente ativos candidatos a novos fármacos (REIS *et al.*, 2011).

Diante de todos esses fatores apresentados e levando em consideração os resultados promissores de atividade anti-inflamatória já alcançados em estudos preliminares com os derivados *N*-acilhidrazônicos, este trabalho se propõe a investigar a toxicidade (toxicidade aguda e citotoxicidade) e as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos. Como muitos processos inflamatórios são agravados por infecção associada, a buscar um fármaco dual, que agregue atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, visando ampliar o leque de novas opções terapêuticas em pacientes críticos, é de extrema importância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade dual de derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos com potencial ação anti-inflamatória e antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana e a ação inibidora da bomba de efluxo NorA, MsrA e Tet(k) dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos;
- Avaliar a citotoxicidade e a toxicidade aguda não clínica dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos derivados em macrófagos murinos;
- Avaliar o efeito dos derivados *N*-acilhidrazônicos sobre Lesão Pulmonar Aguda induzida por LPS em camundongos;
- Realizar análises histopatológicas e imunohistoquímicas do tecido pulmonar de animais induzidos por LPS e tratados com os derivados em estudo;
- Avaliar o efeito dos derivados sobre a produção de óxido nítrico (NO) no lavado broncoalveolar de animais tratados com LPS;
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de animais tratados por LPS;
- Avaliar o estresse oxidativo no tecido pulmonar dos animais tratados por LPS, através da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA);
- Quantificar os níveis das citocinas IL-4, IL6, IL-10, IL-18 e TNF- α no tecido pulmonar de animais induzidos com LPS e tratados com os derivados.

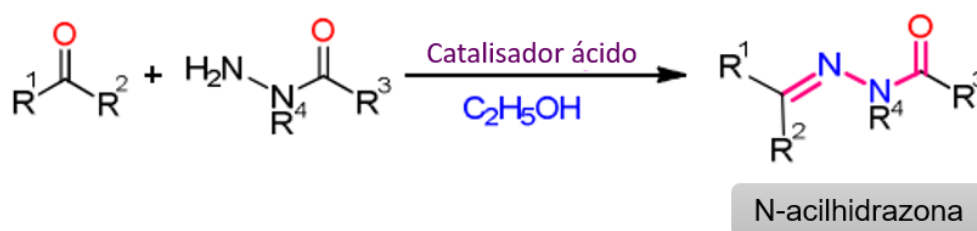
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ACILHIDRAZONAS

As *N*-acilhidrazonas são subestruturas privilegiadas amplamente utilizadas na química medicinal em projetos de candidatos a fármacos e que geralmente são produzidas por uma reação de condensação entre aldeídos ou cetonas com hidrazidas. A funcionalização adequada dessa classe de moléculas pode produzir diversos compostos bioativos com perfis farmacológicos distintos, resultantes da modulação seletiva de diferentes alvos (THOTA *et al.*, 2018).

Atualmente, a função *N*-acilhidrazona (Figura 1) tem sido um dos grupos funcionais mais utilizados na química medicinal, tendo sido identificado em um grande número de compostos promissores que atuam em vários tipos de alvos moleculares (THOTA *et al.*, 2018). Esse grupo funcional tem atraído grande atenção devido à sua facilidade de síntese e por possuir diversas atividades biológicas, tendo sido amplamente utilizado como componente de vários agentes com propriedades antitumorais devido ao seu esqueleto flexível e à presença de doadores e aceptores de hidrogênio. A maioria das acilhidrazonas antitumorais agem através da indução de apoptose em diversas células cancerígenas (OSMANIYE *et al.*, 2018).

Figura 1 - Via sintética básica para a preparação de *N*-acilhidrazonas



FONTE: adaptado (THOTA *et al.*, 2018).

As *N*-acilhidrazonas têm exibido um amplo leque de atividades farmacológicas, como as atividades antimicrobianas, antivirais, antitumorais, anti-inflamatórias, analgésicas, antiprotozoárias, antitrombóticas e antioxidantes (CERQUEIRA *et al.*, 2019). Devido à sua facilidade de síntese e por apresentarem diversas atividades biológicas, tem grande potencial na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (SHEN, XIAOYAN; WANG, YANG; YIN, KAIYUE; SHENG, 2020).

Segundo Thota *et al.* (2018) os medicamentos: nitrofurazona, nitrofurantoína, carbazocromo, testosterona 17-enantato 3-ácido benzílico hidrazina, nifuroxazida, dantroleno e azumolene são relacionados as *N*-acilhidrazonas, foram aprovados e já são utilizados como terapêuticos em vários países.

3.1.1 Acilhidrazonas com atividade anti-inflamatória

A Tabela 1 apresenta as pesquisas realizadas nos últimos 5 anos de *N*-acilhidrazonas com atividade anti-inflamatória, após análise detalhada dos artigos selecionados, mostrando a *N*-acilhidrazona estudada, o tipo de estudo, a atividade, metodologia empregada na pesquisa, a conclusão após análise dos resultados encontrados nos estudos e as referências.

Tabela 1 - Estudos selecionados para a revisão de literatura acerca das *N*-acilhidrazonas com atividade anti-inflamatória

<i>N</i>-acilhidrazona	Tipo de estudo	Objetivo	Metodologia	Conclusão	Referência
LASSBio-1828 (aminopiridinil - <i>N</i> -acilhidrazona)	<i>In vivo</i>	atividade anti-inflamatória	Edema de pata induzida por formalina e migração celular induzida por carragenina no bolsão de ar subcutâneo	Bloqueio da migração celular e redução da produção de mediadores.	(CORDEIRO <i>et al.</i> , 2020a)
LASSBio-1524 e seus análogos (LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764)	<i>In vivo</i>	atividade anti-inflamatória	Colite, que mimetizam a doença de Crohn (induzida por ácido dinitrobenzeno) e colite ulcerativa (induzida por sulfato de dextrano de sódio) em camundongos.	Redução da secreção do fator de necrose tumoral- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN- γ e aumento da secreção de IL-10, proteção da homeostase gastrointestinal.	(CORDEIRO <i>et al.</i> , 2020b)
LASSBio 1823, LASSBio 1824, LASSBio 1827 e LASSBio 1832 (derivados naftil- <i>N</i> -	<i>In vivo</i>	atividade anti-inflamatória	Migração celular induzida por carragenina no bolsão de ar subcutâneo	LASSBio -1824 foi o melhor inibidor de p38 α MAPK, com IC ₅₀ = 4,45 μ M, e também se mostrou como protótipo	(FREITAS <i>et al.</i> , 2018)

acilhidrazona)				mais promissor com boas ações anti-inflamatórias e anti-TNF- α	
SintMed65 (<i>N</i> '- [(1E) - 3- (4-nitrofenilhidrazono)] - (2E) -propan-2-ilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida)	<i>In vivo</i>	atividade anti-inflamatória	Modelo de camundongo com inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina	Redução da celularidade e o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar, redução da produção das citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-13 no BALF e a expressão dos genes IL-4, IL-10 e CCL8 no pulmão	(CERQUEIRA <i>et al.</i> , 2019)
LASSBio-1586	<i>In vivo</i>	comportamento nociceptivo e a atividade anti-inflamatória	Atividade antinociceptiva - testes de contorção induzida por ácido acético e de nocicepção induzida por formalina. Atividade anti-inflamatória - métodos de	LASSBio-1586 exibiu um potencial antinociceptivo e anti-inflamatório relevante e atuou em vários alvos	(SILVA <i>et al.</i> , 2018)

			inflamação aguda e crônica induzida por diferentes produtos químicos (carragenina, histamina, óleo de cróton, ácido araquidônico) e agentes físicos (pellet de algodão)		
(E) -N'- (3,4-dimetoxibenzilideno) - 4-metoxibenzohidrazida (LASSBio-1386)	<i>In vivo</i>	atividade imunomoduladora e anti-inflamatória	Culturas de macrófagos, Modelo de choque endotóxico induzido por LPS em camundongos, <i>in vitro</i> e Modelo de hipersensibilidade do tipo retardado induzido por BSA.	LASSBio-1386 possui uma potente atividade imunomoduladora mediada por sua ação inibidora de PDE-4 via inibição da via NF-κB e pode ser útil no tratamento de doenças inflamatórias ou imunomediadas	(GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2018)
Derivados indol-N-acilhidrazona	<i>In vivo</i> and	Atividade anti-inflamatória	Ensaio de citotoxicidade com macrófagos murino	Atividade anti-inflamatória foi	(MORAES <i>et al.</i> , 2018)

	<i>in vitro</i>		da linhagem celular J774 e linfoproliferação	avaliada; são potenciais agentes para atuar na fase celular do processo de inflamação; a supressão do edema de pata de camundongo foi observada na fase tardia (fase celular); sobre o inibição de COX-1 e COX-2 indica um como um inibidor seletivo de COX-2.	
4- (nitrofenil) hidrazona de <i>N</i> -acilhidrazona	<i>In vivo</i> and <i>in vitro</i>	Atividade anti-inflamatória	Ensaio de citotoxicidade com macrófagos murino da linhagem celular J774, linfoproliferação e peritonite aguda em camundongos.	A atividade anti-inflamatória: modulação da secreção de IL-1 β e síntese da prostaglandina E ₂ em macrófagos e inibição da atividade da calcineurina fosfatase	(MEIRA <i>et al.</i> , 2018)

				em linfócitos. O composto SintMed65 administrado via oral, inibiu a infiltração de neutrófilos em um modelo agudo de peritonite em camundongos.	
Híbridos multifuncionais de <i>N</i> - benzil-piperidina-aril-acil-hidrazona e híbridos de aril-acilhidrazona-donepezil		Atividades multi-alvo relacionadas à doença de Alzheimer Atividade anti-inflamatória	Citotoxicidade <i>in vitro</i> em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), células HepG2 de fígado humano e células SH-SY5Y neuronais. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> (Nocicepção induzida por formalina, edema de pata induzido por	Os compostos 4c e 4g exibiram atividade anti-inflamatória concomitante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , contra neuroinflamação induzida por oligômero beta amiloide (A β O); 4c e 4g inibiram a COX-1/2 e a liberação de TNF- α em células microgliais ativadas.	(DIAS VIEGAS <i>et al.</i> , 2018)

			carragenina)		
Derivados de N-acilhidrazonas LASSBio-294 e LASSBio-897		Efeito gastroprotetor Atividade anti-inflamatória	Modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos foram investigados com relação à via NO/cGMP/K _{ATP}	Os derivados reduziram significativamente a área microscópica e macroscópica da lesão, restauraram os níveis de GSH, MDA e hemoglobina, reduziram a atividade de MPO e as concentrações de nitrato e nitrito nas amostras de estômago após a administração de etanol e reduziram os níveis de TNF- α e IL-1 β .	(DA SILVA MONTEIRO <i>et al.</i> , 2019)
Derivados de isoxazolina-acil-hidrazona: N'-(4-metoxibenzilideno)-6-		Atividade anti-inflamatória	Modelo de bolsão de ar induzido por carragenina; Edema de pata induzido por diversos agentes	Os resultados indicam que R-99 e R-123 apresentam atividade anti-inflamatória	(MOTA <i>et al.</i> , 2019)

(4-nitro-benzoil)- 3a,5,6,6a-tetra-hidro- 4H-pirrolol[3,2- d]isoxazol-3- carbohidrazida (R-123) e N'-(4- clorobenzilideno)-6-(4- clorobenzoil)- 3a,5,6,6a-tetra-hidro- 4H-pirrolol[3,2- d]isoxazol-3- carbohidrazida (R -99)			flogísticos; Permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e Um estudo <i>docking</i> com o receptor H1 da histamina humana para investigar a potencial atividade anti- histamínica.	promissora relacionada à sua capacidade de inibir a produção de TNF- α , IL-1 β e amina vasoativa, além de reduzir a migração de leucócitos e inibir a degranulação de mastócitos.	
Análogos de N-(2- benzamidoferuloil) Aril- hidrazona (3a-I)		Atividades anti- inflamatória, analgésica e antioxidante	Edema de pata e contorções abdominais (<i>in vivo</i>); Determinação da IC50, métodos de peroxidação lipídica e de eliminação de DPPH (<i>in vitro</i>); Docking	Redução do edema de pata, boas pontuações de docking, boa atividade no teste de contorções e na atividade anti- inflamatória e apreciável potencial antioxidante com	(SOUJANYA <i>et al.</i> , 2018)

				afinidades de múltiplos alvos.	
Filmes CHI contendo (Z)-N'-(1H-indol-3-il)metileno)-2-cianoacetohidrazida		Inflamação tópica	Ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar e viabilidade celular com a linhagem celular L929	O sistema CHI + JR19 influenciou positivamente as propriedades mecânicas e conferiu melhor compatibilidade com ambientes biológicos, mostrando potencial para tratar inflamações cutâneas.	(WANDERLEY <i>et al.</i> , 2020)
N -fenil sulfonamida ligada N -acilhidrazonas (NPS-NAH)		Atividades anti-inflamatória, antioxidantes e antimicrobiana	Ensaio COX-1 e COX-2 <i>in vitro</i> ; Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> (Edema de pata em rato induzido por carragenina); Ensaio de antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil); Determinação da	Novas N sulfonamida - fenil ligada N -acilhidrazonas (NPS-NAH) como novos potenciais agentes anti-inflamatórios.	(GORANTLA <i>et al.</i> , 2017)

			atividade antibacteriana (método difusão em agar) e docking molecular		
--	--	--	--	--	--

3.2 INFLAMAÇÃO

3.2.1 Fisiopatologia da Inflamação

O processo inflamatório é caracterizado pela produção de fluidos, substâncias químicas e células lesadas, com alterações vasculares, recrutamento e ativação de leucócitos para induzir o reparo celular, levando a alterações teciduais e funcionais que são os cinco sinais principais no processo inflamatório: calor, vermelhidão, edema, dor e perda de função. O calor e a vermelhidão são consequências da vasodilatação e o aumento da temperatura pelo maior fluxo sanguíneo. O edema é consequência do aumento da permeabilidade vascular que permite o extravasamento vascular de líquidos e a formação do edema (ETIENNE, R.; VIEGAS, F. P. D.; VIEGAS JR., 2020).

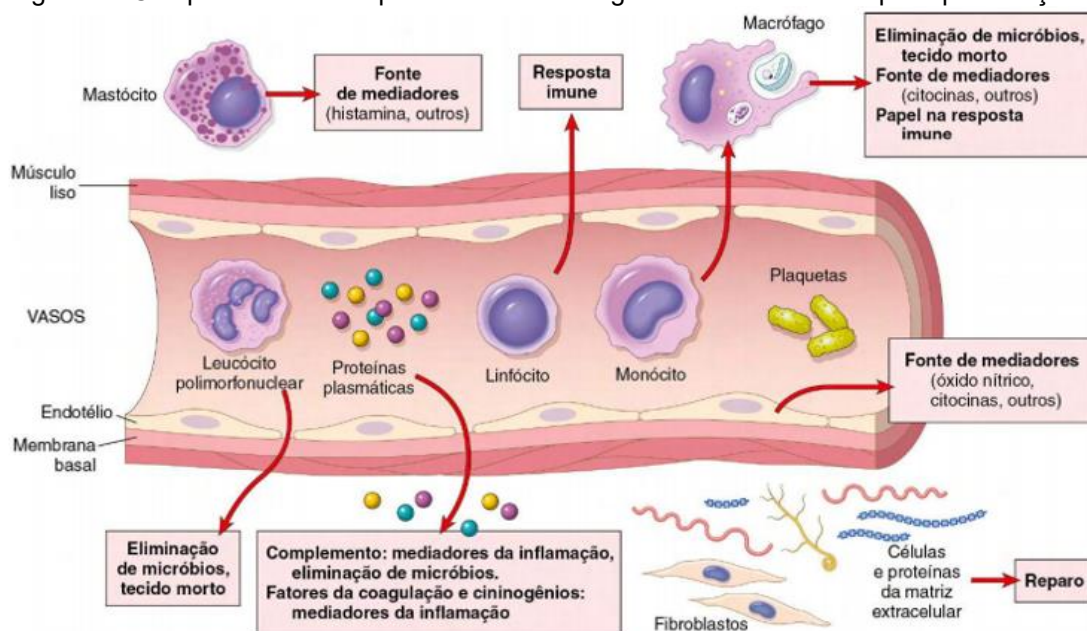
A inflamação é geralmente descrita com a fase aguda e a fase crônica, embora haja sobreposição entre esses processos. Na fase aguda, leucócitos, principalmente granulócitos, migram ao longo de um gradiente quimiotático para o local da lesão que é mediado por citocinas e proteínas de fase aguda, com o objetivo de remover o agente inflamatório, o estímulo ou as células danificadas pela lesão e iniciar a cura (GERMOLEC *et al.*, 2018).

A inflamação aguda é classificada de acordo com as características do exsudato, de acordo com o tipo, duração e intensidade da agressão. Os mediadores envolvidos no processo agudo são as aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, que incluem as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, o fator de ativação plaquetária (FAP), quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF), e citocinas, com as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 e IL-18 (NASURUDDIN., 2022).

A resposta inflamatória aguda é uma fase complexa, mas segue uma sequência altamente coordenada de eventos envolvendo moléculas, alterações celulares e fisiológicas para neutralizar, inativar e eliminar o agente causador da inflamação, substituindo os tecidos danificados por fibrose, culminando com o reparo tecidual e

bloqueio da resposta inflamatória (Figura 2) (SERHAN, 2017).

Figura 2 - Componentes da resposta inflamatória aguda e crônica e suas principais funções.



Fonte: Adaptado (ROBBINS, 2016)

As respostas inflamatórias agudas são iniciadas por lesão, infecção e irritação, que, por sua vez, protegem o hospedeiro de infecções sistêmicas e ajudam a restaurar a homeostase tecidual. Tipicamente, eventos moleculares e interações celulares prevalentes durante respostas inflamatórias agudas são eficientes em minimizar lesão iminente, infecção ou irritação, o que leva a importante restauração da homeostase tecidual e, assim, completa resolução da resposta inflamatória aguda. No entanto, se uma resposta inflamatória aguda é montada descontroladamente em termos de magnitude ou duração, pode levar à doença crônica (ROBB *et al.*, 2016; WONG; MAGUN; WOOD, 2016).

A inflamação quando é persistente é caracterizada pela ocorrência simultânea da ativação inflamatória e destruição tecidual, como resultado de uma prolongada exposição a estímulos inflamatórios, podendo levar à fase crônica, na qual as populações ativas de células imunes mudam para expressar um fenótipo mononuclear, e podem ocorrer danos nos tecidos e fibrose (OISHI; MANABE, 2018).

A inflamação crônica pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, incluindo artrite, asma, aterosclerose, doenças autoimunes, diabetes e câncer. O processo inflamatório envolve múltiplos sistemas fisiológicos, sendo que, o

sistema imunológico desempenha um papel central responsável pelas informações detalhadas sobre as células, as moléculas da superfície celular e os mediadores inflamatórios (GERMOLEC *et al.*, 2018).

O processo crônico também pode envolver interações complexas entre diferentes células e seus mediadores secretados, como as citocinas IL-17, IL-12 e IL-23. Neste processo, os macrófagos aparecem dispersos em vários tecidos conjuntivos, fígado, baço, linfonodos e no sistema nervoso central, e constituem o sistema de fagócitos mononucleares, que atua como um filtro para materiais particulados, microrganismos e células senescentes, com função de eliminar microrganismos nas respostas imunes humorais e celulares (FANONI *et al.*, 2019).

Durante uma resposta inflamatória, os macrófagos podem ser ativados pela via clássica induzida por endotoxinas, no caso de uma injúria por patógeno (bactérias, fungos, vírus, etc.). Uma vez ativados, os macrófagos produzem enzimas lisossomais como a NADPH-oxidase, aumentando sua capacidade de destruir organismos por fagocitose e secretar outras citocinas que estimulam a inflamação, sendo, portanto, células especialmente importantes na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. Os macrófagos podem ser ativados pela via alternativa onde estes são induzidos por citocinas, como as interleucinas IL-4 e IL-3 sintetizadas por linfócitos T (ETIENNE, R.; VIEGAS, F. P. D.; VIEGAS JR., 2020). No contexto da inflamação, o aumento de linfócitos, de células fagocíticas infectadas, a instalação de doenças autoimunes ou a incapacidade de amortecer a resposta imune, além da malignidade, são consideradas consequências de morte celular, tais como apoptose, necrose, necroptose, autofagia e piroptose (GHASEMI *et al.*, 2019).

3.2.2 Mediadores do Processo Inflamatório

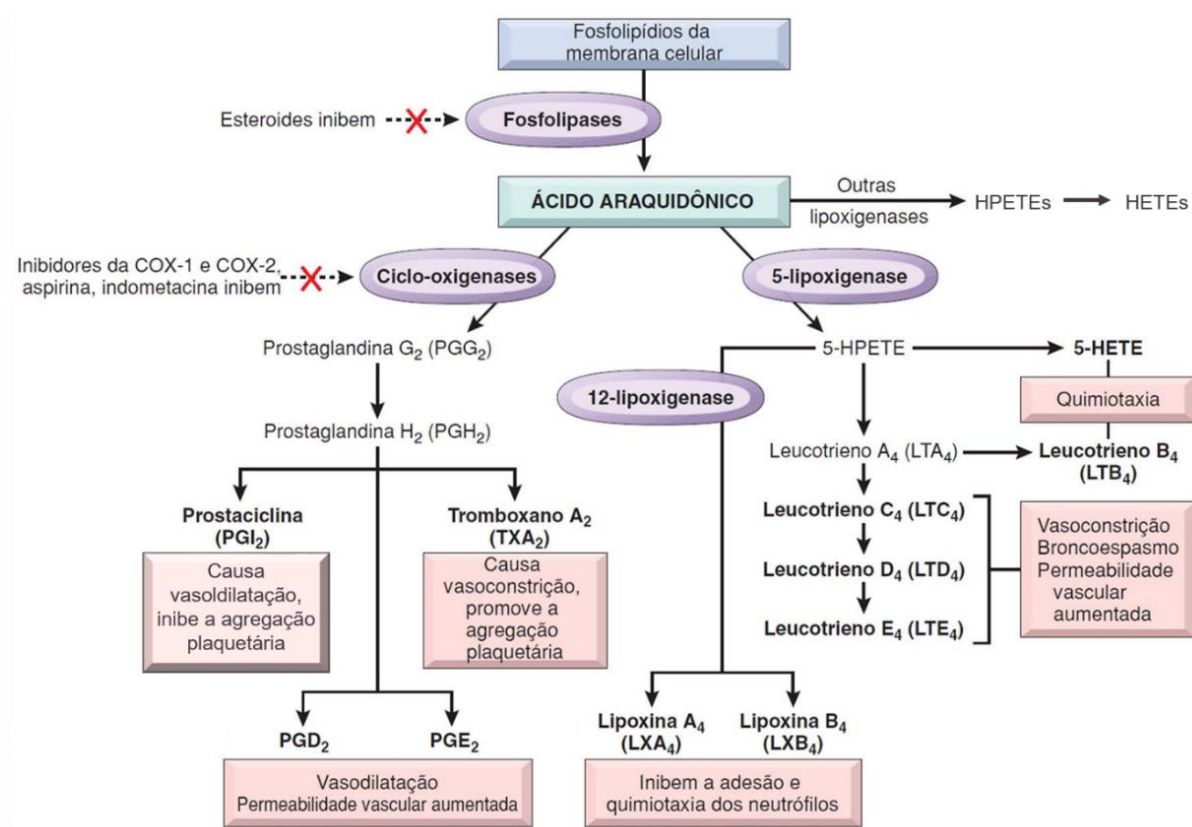
Mediadores inflamatórios são moléculas produzidas por células ativadas que intensificam e prolongam a resposta inflamatória (BRANCO *et al.*, 2018). Uma variedade de mediadores químicos presentes no sistema circulatório está envolvida no processo inflamatório além de, células inflamatórias que liberam as citocinas, o tecido lesado que contribuem ativamente e ajustam a resposta inflamatória (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os mediadores químicos liberados incluem

aminas vasoativas como histamina e serotonina, peptídeo como bradicinina e eicosanóides como tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas.

A histamina é liberada em pequena quantidade para manter a resposta de fase aguda durante o processo de inflamação. A serotonina é produzida através da descarboxilação do triptofano e é armazenada no grânulo. Em murinos, a serotonina está disponível em grânulos basofílicos, enquanto em humanos, está presente nas plaquetas (WEISSMANN, 2013). A bradicinina pode aumentar a síntese de prostaglandinas e produzir dor localmente (RASKIN; MEYER, 2016).

Os eicosanóides são um dos principais mediadores biologicamente ativos da inflamação, têm como precursor o ácido araquidônico (AA) que é o principal componente dos fosfolipídios da membrana em todas as células. Entre os eicosanóides estão os produtos da 5-lipoxigenase (5-LOX) tais como a 12-lipoxigenase e leucotrienos e da cicloxigenase (COX) tais como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (Figura 3) (LIEBERMAN -, 2017).

Figura 3 - Metabólitos do ácido araquidônico e eicosanóides.



Fonte: Adaptado (ROBBINS, 2016)

A produção da proteína 5-LOX ocorre principalmente nas células imunes de origem mielóide: células mononucleares, como macrófagos e linfócitos e leucócitos polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos. Essas células desempenham um papel vital nas reações inflamatórias das respostas imunológicas (OKUNO, 2020). A enzima 5-LOX inicia a biossíntese dos leucotrienos (LTs), potentes mediadores da resposta inflamatória, com uma reação em duas etapas que se inicia com a oxigenação do substrato ácido araquidônico para gerar o intermediário 5- ácido S- hidroperoxieicosatetraenóico (5- S- HPETE) (GILBERT *et al.*, 2020).

A ciclo-oxigenase é uma enzima envolvida na síntese das prostaglandinas (PGs) pró-inflamatórias e tromboxanos (TXs) e na conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H_2 , como primeira etapa dos processos inflamatórios (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). Foram identificadas, três isoformas de enzimas COX, como COX-1, COX-2 e COX-3, essas isoenzimas têm diferentes características enzimáticas e padrões de expressão gênica distintos (JAFARNEZHAD-ANSARIHA *et al.*, 2018). A COX-1 é amplamente expressa em grande quantidade de tecidos, sendo responsável pela produção fisiológica de prostanóides, agregação plaquetária, manutenção da homeostase e da integridade da mucosa gastrointestinal. A presença de COX-1 foi demonstrada tanto no trato respiratório superior como no inferior, bem como na pleura (BAIGENT *et al.*, 2013).

A COX-2 participa de processos fisiológicos e patológicos. No período pós-natal, a expressão de COX-2 é baixa e limitada ao epitélio brônquico e alvéolos pulmonares, também está associada à inflamação ou alterações proliferativas no epitélio das vias aéreas, incluindo pneumonia e câncer de pulmão. Semelhante à COX-1, a COX-2 desempenha um papel importante na inflamação pulmonar alérgica e na asma (ŁANOCHA-ARENDARCZYK *et al.*, 2018). A intensidade da inflamação, por exemplo, nos tecidos pulmonares, depende da funcionalidade do sistema imunológico. Na pneumonia, a imunidade inata do tecido pulmonar pode ser regulada pelo aumento da expressão de citocinas, quimiocinas e ciclo-oxigenase (LEE; YANG, 2013).

As prostaglandinas (prostaglandina E2 e prostaglandina b) são envolvidas na conservação do processo inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e fortalecendo a expressão de outros mediadores inflamatórios, como quinina, serotonina e histamina, contribuindo assim para a vermelhidão, aumento do fluxo sanguíneo, e exsudação de plasma na área de inflamação aguda que leva ao edema,

produzem hiperalgesia ao afetar as fibras C aferentes e atuam nos neurônios da rede termorreguladora do hipotálamo, causando um aumento na temperatura corporal (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

As doenças inflamatórias das vias aéreas e pulmonares, como asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são caracterizadas por inflamação crônica. Muitas das proteínas alvo inflamatórias conhecidas, como a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), ciclo-oxigenase-2, e fosfolipase citosólica A₂ (PLA_{2c}), estão associados a vias de sinalização inflamatórias induzidas por vários estímulos, incluindo fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), adenosina-5'-trifosfato (ATP), extrato de fumaça de cigarro, ácido lipoteicoico (LTA) ou lipopolissacarídeo (LPS) (LEE; YANG, 2013).

3.2.2.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula de sinalização celular que participa de diversas funções fisiológicas que envolvem a vasodilatação, o relaxamento do músculo liso, a neurotransmissão e a resposta imune. O NO é produzido por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOSs) pela oxidação de L-arginina (L-Arg) a L-citrulina. Existe em três isoformas, NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS). A nNOS é encontrada principalmente no sistema nervoso e é necessária para a sinalização neuronal, enquanto a eNOS está localizada no endotélio e é essencial para vasodilatação e controle da pressão arterial. A iNOS, por outro lado, só é expressa quando a célula é induzida ou estimulada, normalmente por citocinas pró-inflamatórias e / ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (CINELLI *et al.*, 2020).

O óxido nítrico desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da inflamação sendo considerado um mediador pró-inflamatório em situações anormais, apesar de atuar como um agente anti-inflamatório em condições fisiológicas normais. A iNOS secreta NO como um mediador inflamatório, resultando em vasodilatação no local da inflamação e edema. Portanto, a inibição da produção de NO por meio da

inibição da atividade da enzima iNOS e/ou da expressão da proteína pode ser uma abordagem útil para o tratamento da inflamação (GAMAL EL-DIN *et al.*, 2020).

3.2.2.2 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase humana presente principalmente em grânulos de neutrófilos, monócitos e macrófagos (HU *et al.*, 2021; VANHAMME *et al.*, 2018). É a única enzima capaz de gerar ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante necessário no combate de patógenos invasores, em quantidades relevantes (VLASOVA, 2018). Além disso, a MPO, está presente na formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são estruturas constituídas principalmente de fibras de cromatina e proteínas de grânulos citoplasmáticos, que auxiliam na defesa contra os microrganismos (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018).

A MPO atua doando prótons ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de íons cloreto, gerando HOCl (TJONDRO *et al.*, 2021). Este, mesmo em pequenas concentrações, é responsável por causar danos celulares e destruição de tecidos, se difundindo pelo plasma e inibindo enzimas como a creatina quinase e lactato desidrogenase. Além disso, causa distúrbios no processo energético, pois o HOCl interage com o ATP (NDREPEPA, 2019).

Apesar de sua grande importância no sistema imunológico, ajudando na cura de doenças, quando há uma exacerbação da produção de agentes oxidantes, a MPO está associada a causa ou progressão de várias doenças, devido à sua propriedade de intensificar a inflamação e causar injúria aos tecidos, através do dano causado no DNA das células, mesmo na ausência de infecção (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018). Como por exemplo na hipertensão arterial pulmonar, na artrite reumatoide, em doenças neurodegenerativas, em doenças cardiovasculares, na obesidade, diabetes e na aterosclerose (KOCH *et al.*, 2021).

A mieloperoxidase produzida durante estados inflamatórios é liberada no soro, embora em condições não inflamatórias a MPO não seja encontrada nos espaços extravasculares, uma das primeiras consequências da inflamação é a localização da atividade da MPO nos locais de infiltração de neutrófilos (VANHAMME *et al.*, 2018).

3.2.2.3 Malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica aumentada ocorre durante o estresse oxidativo, o qual induz a uma superprodução de espécies reativas de nitrogênio (RNS) ou espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem reagir com outras biomoléculas, como lipídios, para gerar diferentes compostos, incluindo MDA. Sendo assim, a peroxidação lipídica representa uma das principais fontes de ROS. Os níveis plasmáticos de MDA, portanto, refletem a significância da peroxidação lipídica e a gravidade do estresse oxidativo (CALDIROLI *et al.*, 2020).

As fontes mais relevantes de MDA endógeno estão associadas a vários ácidos graxos poli-insaturados como ácido araquidônico e linoléico, por meio de vias e enzimas envolvidas na produção de tromboxanos, prostaglandinas e glutathione (GSH). Nas plaquetas, durante agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico, há a formação de grandes quantidades de MDA, que é inibida pelos inibidores da COX, como ácido acetilsalicílico e indometacina (PALIOGIANNIS *et al.*, 2018).

O MDA, produzido a partir da peroxidação lipídica aumentada durante o estresse oxidativo, pode se ligar a biomoléculas autólogas, gerando assim epítomos capazes de induzir respostas biológicas potencialmente indesejadas. Portanto, o sistema imunológico desenvolveu mecanismos para proteger dos epítomos do MDA, ligando-os e neutralizando-os por meio de efetores celulares e solúveis (BUSCH; BINDER, 2017). Assim, o MDA é um marcador que caracteriza a peroxidação lipídica sistêmica na DPOC, e é medido como substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA pode reagir com os grupos amino livres (-NH₂) de proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos levando a modificações e alterações estruturais do sistema imunológico e da cascata inflamatória (PALIOGIANNIS *et al.*, 2018).

3.2.2.4 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas que são produzidas e secretadas por quase todas as células, para regular e influenciar a resposta imune. A liberação de citocinas pró-inflamatórias leva à ativação e produção de células imunes, bem como a liberação de mais citocinas. Portanto, a liberação simultânea de citocinas pró e anti-inflamatórias são obrigatórias em qualquer resposta imune (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

As respostas imunes são moduladas por citocinas relacionadas às células T auxiliares (Th) (KHORRAMI *et al.*, 2022). Essas células contribuem para a regulação das respostas imunes, o desequilíbrio nos subconjuntos de células T auxiliares (Th1/Th2/Th17) e células T reguladoras (Tregs) podem contribuir na patogênese do COVID-19. As células T CD4⁺ são divididas em diferentes subtipos com base em sua produção de citocinas, incluindo células Th1 (que produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- α), células Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), células Th17 (IL-17, IL-22) e Treg (TGF- β , IL-10) entre outros (GHAZAVI *et al.*, 2021)

A via do TNF- α desempenha um papel fundamental nas doenças inflamatórias agudas, a exemplo da LPA, a sinalização desregulada do TNF- α provoca a morte celular e ativa os neutrófilos e macrófagos residentes nos tecidos. Essas células inflamatórias residentes ativadas secretam TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-8, que por sua vez recrutam leucócitos polimorfonucleares (PMNs) para os tecidos danificados e agravam a cascata de sinalização de morte celular. Por outro lado, a via do TNF- α também é o principal regulador do reparo tecidual após lesão aguda, ativa as vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B que induzem a proliferação e diferenciação celular, ativa células progenitoras residentes e mobilizam células-tronco circulantes para regeneração tecidual (LAI *et al.*, 2019).

A interleucina-4 (IL-4) é uma citocina derivada de linfócitos Th2 que pode induzir macrófagos M2 (TAKENAKA *et al.*, 2021) e é a citocina chave que regula a cascata inflamatória na asma, desde a quimiotaxia de eosinófilos até a diferenciação de células T auxiliares em células Th2. Desempenha papéis importantes na modulação da resposta imune tipo 2, na troca de isotipos de IgM/IgG para IgE pelos linfócitos B e no recrutamento de mastócitos, além de atuar na remodelação das vias aéreas através de seus efeitos desencadeantes nas células produtoras de muco e fibroblastos (ELSAID *et al.*, 2021).

A interleucina-6 (IL-6) pode ser produzida por quase todas as células do estroma e por células do sistema imunológico, como linfócitos B, linfócitos T,

macrófagos, células dendríticas, monócitos, mastócitos, fibroblastos e células endoteliais. Os principais ativadores da expressão da IL-6 são a IL-1 β e TNF- α , mas muitos outros fatores podem contribuir para sua secreção, como receptores Toll-like (TLRs), prostaglandinas, adipocinas, resposta ao estresse e outras citocinas. Na fase inicial da inflamação infecciosa, a IL-6 é produzida por monócitos e macrófagos estimulados pelos TLRs, sendo um importante mediador de fase aguda (MAGRO, 2020).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória produzida por linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas e podem inibir a ativação das células imunes e estimular as ações imunossupressoras das células T reguladoras (Tregs) além de reduzir a inflamação (CZAJA, 2022). O receptor IL-10R é responsável pela sinalização de IL-10 e é composto pelos dímeros alfa IL10R α e beta IL10R β . O primeiro é um receptor específico de IL-10, enquanto o último aumenta a afinidade de IL-10 para se ligar a IL10R α . De fato, IL10R β não pode se associar com IL-10 independentemente e é mais amplamente expresso que o IL10R α em muitas células de tecido, enquanto IL10R α é expresso principalmente em células imunes como células T, neutrófilos após administração de LPS *in vitro* ou monócitos em um modelo de camundongo com endotoxemia LPS (CZAJA, 2022; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória relacionada à família IL-1 particularmente à IL-1 β . A IL-18, semelhante à IL-1 β , é sintetizada como um precursor inativo e precisa de uma clivagem mediada pela caspase 1 para se tornar biologicamente ativa (PRENCIPE; BRACAGLIA; DE BENEDETTI, 2019). Apesar de se ligarem a diferentes receptores, IL-1 β e IL-18 usam as mesmas vias de sinalização. A IL-18 desempenha papéis importantes na lesão pulmonar, seus níveis plasmáticos estão elevados em pacientes com sepse/SDRA, que é a forma grave da LPA, também possui características de outras citocinas pró-inflamatórias, como aumento das moléculas de adesão celular, síntese de óxido nítrico e produção de quimiocinas (KAPLANSKI, 2018).

A proteína de ligação de IL-18 (IL-18BP), um antagonista natural de IL-18, liga-se a IL-18 com alta afinidade é capaz de neutralizar a sua atividade biológica e tem efeito protetor contra a lesão de reperfusão de isquemia cardíaca, renal e inflamação sistêmica induzida por endotoxinas (PRENCIPE; BRACAGLIA; DE BENEDETTI,

2019). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito protetor da IL-18BP contra danos pulmonares induzidos por LPS (ZHANG *et al.*, 2018).

3.2.3 Resposta Imune e Inflamação

Apesar de a inflamação ser um mecanismo benéfico de defesa em alguns casos, pode levar a alergias, doenças auto-imunes e rejeição de órgãos (GAMAL EL-DIN *et al.*, 2020). As respostas imunes inatas, no pulmão, são iniciadas por macrófagos alveolares residentes no tecido, monócitos e granulócitos infiltrantes. A produção inicial de citocinas pró-inflamatórias no pulmão pode precipitar tempestades de citocinas em infecções respiratórias graves, como ocorre na COVID-19. As respostas imunes adaptativas mediadas por células T CD4⁺ e CD8⁺ envolvem a mobilização de células T efetoras para o pulmão para mediar a depuração de células infectadas *in situ* (SZABO *et al.*, 2021).

A resposta inflamatória a partir da administração do lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, ocorre através da ativação de células imunes por meio do receptor Toll-like (TLR-4) (KIM *et al.*, 2019). Os neutrófilos são o primeiro grupo de leucócitos que respondem à inflamação, tanto na administração de LPS como na infecção bacteriana. Essa resposta envolve adesão e migração através do endotélio da corrente sanguínea para os tecidos inflamatórios (ALIZADEH-TABRIZI; HALL; LEHMANN, 2021).

3.3 LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA) E A SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA)

3.3.1 Epidemiologia e fisiopatologia da LPA/SDRA

Os dados mais recentes da epidemiologia da LPA são de 10 anos, a distribuição

da LPA não é uniforme entre as classes demográficas. Sabe-se que o número de pacientes idosos na UTI continua a aumentar com o envelhecimento da população (NGUYEN *et al.*, 2011). As patologias precursoras da LPA mais comuns são sepse, pneumonia, aspiração, pancreatite, transfusões de sangue de grande volume e inalação de fumaça ou gás tóxico. Para pacientes com múltiplas comorbidades, abuso crônico de álcool ou doença pulmonar crônica, o risco de lesão pulmonar é maior.

Na década de 1980, as taxas de mortalidade por LPA foram de aproximadamente 64%-70%. Estudos mais recentes agora indicam um risco de mortalidade de 29%-42% (SWENSON; SWENSON, 2021; ZAMBON; VINCENT, 2008). A patologia que causou LPA é um determinante importante para avaliar a mortalidade, sendo a sepse associada à maior taxa de mortalidade (43%), enquanto os diagnósticos não infecciosos, como traumas graves, apresentam um risco significativamente menor de morte (11%) (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

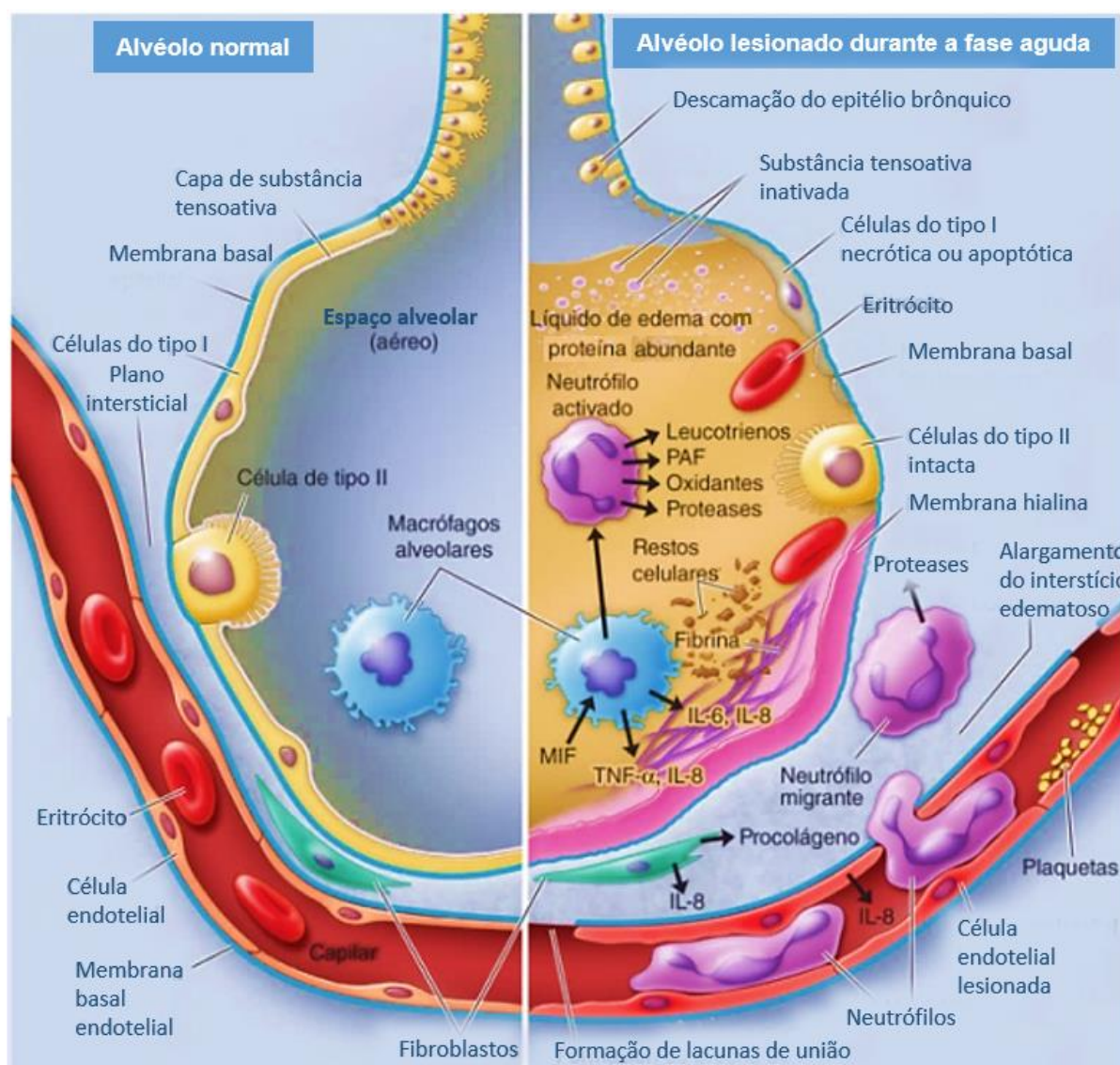
A lesão pulmonar aguda e a síndrome do desconforto respiratório agudo são as manifestações pulmonares de um processo inflamatório sistêmico agudo caracterizado clinicamente por infiltrados pulmonares, hipoxemia e edema devido à lesão endotelial e epitelial, infiltração de neutrófilos e leucócitos, citocinas, oxidantes, desregulação da coagulação e alveolite fibrosante (ABEDI *et al.*, 2020).

Em 1994, a Conferência de Consenso Americano-Europeu (AECC) estabeleceu critérios específicos para diferenciar a SDRA e LPA. Definiram LPA e SDRA como insuficiência respiratória aguda com infiltrados pulmonares bilaterais na radiografia de tórax e hipoxemia através da observação da relação de pressão parcial de oxigênio arterial/fração de oxigênio inspirado menor que 300 para LPA e menor que 200 para SDRA (SWEATT; LEVITT, 2014).

O pulmão normal funciona como uma barreira seletiva para fluidos e solutos, com a superfície coberta por pneumócitos do tipo I e II facilitando a excreção de CO₂ e o transporte de oxigênio através da membrana do alvéolo capilar. O pneumócito tipo II cria o fator surfactante e reduz o estresse para manter o alvéolo aberto e facilitar a difusão. Ambos os tipos de pneumócitos têm a capacidade de transportar fluidos através da bomba Na⁺/K⁺-ATPase, onde este fluido é removido pela circulação linfática e a purificação do alvéolo é realizada por macrófagos alveolares, que podem ser rapidamente recrutados da circulação em caso de lesão pulmonar, que juntamente com outros fatores, plaquetas e monócitos constituem peça fundamental na defesa de danos pulmonares (RUBÉN, *et al.*, 2019).

A SDRA é desencadeada por uma resposta inflamatória de uma lesão inicial, que gera ativação de macrófagos, que por sua vez, geram citocinas pró-inflamatórias como metabólitos derivados do ácido araquidônico, fator de necrose tumoral, interleucinas e fatores pró-coagulantes que geram ativação da cascata de coagulação e trombose do capilar pulmonar. Por outro lado, ocorre a migração de neutrófilos polimorfonucleares dos capilares pulmonares para o interstício e finalmente para o alvéolo, danificando os tecidos por meio de espécies reativas de oxigênio e proteases, causando edema e dificultando a troca de oxigênio e dióxido de carbono (Figura 4) (HERRERO *et al.*, 2020).

Figura 4 - Esquema mostrando o alvéolo normal e o alvéolo lesionado durante a fase aguda.



Fonte: adaptado de NIETO *et al.*, 2019.

A SDRA é composta por três fases, a exsudativa e a proliferativa e a fibrótica.

1. A resposta inicial do pulmão à lesão, referida como fase exsudativa da SDRA, é caracterizada por danos mediados por células imunes inatas das barreiras endoteliais e epiteliais alveolares (STANDIFORD; WARD, 2016). Macrófagos alveolares residentes secretam citocinas pró-inflamatórias, levando ao recrutamento de neutrófilos e monócitos ou macrófagos, bem como ativação de células epiteliais alveolares e células T efectoras, para promover e manter a inflamação e lesão tecidual (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017).
2. Os processos de reparo iniciados durante a segunda fase, proliferativa, da SDRA são essenciais para a sobrevivência do hospedeiro. Uma vez que a integridade epitelial tenha sido restabelecida, a reabsorção do edema alveolar e a matriz provisória restauram a arquitetura e a função alveolar (AYRES, 2020).
3. A fase final – fibrótica - da SDRA não ocorre em todos os pacientes, mas tem sido associada à ventilação mecânica prolongada e aumento da mortalidade (VASARMIDI *et al.*, 2020).

3.3.2 Lesão Pulmonar Aguda, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo e COVID-19

Um novo coronavírus surgiu em dezembro de 2019 (SARS-CoV-2), causando uma doença infecciosa com risco de vida, denominada Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (COVID-19) (HUANG *et al.*, 2020; ZUMLA; NIEDERMAN, 2020). Foi identificada pela primeira vez na província de Wuhan, na China e se disseminou rapidamente, atingindo mais de 100 países nos cinco continentes, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar a COVID-19 como uma pandemia no dia 11 de março de 2020 (MARINELLI *et al.*, 2020).

Em muitos pacientes com infecção por SARS-CoV-2 ocorre o desenvolvimento de LPA e SDRA. O edema pulmonar é uma das características clínicas e estágios críticos da evolução da doença. A ocorrência e a gravidade da LPA são um importante fator determinante do prognóstico de pacientes com infecção por COVID-19 (LI *et al.*, 2020). Cerca de 30% dos pacientes em UTI desenvolveram edema pulmonar grave, dispneia, hipoxemia ou mesmo SDRA (HUANG *et al.*, 2020). A SDRA ocorre como

resultado de uma resposta inflamatória sistêmica aguda, que pode ser causada por agressões ao pulmão, diretas ou indiretas. O estágio exsudativo inicial apresenta dano alveolar difuso com destruição de células epiteliais e endoteliais. A COVID-19 afeta principalmente o sistema respiratório com pequenos danos a outros órgãos (XU *et al.*, 2020b).

A patogênese da COVID-19 foi postulada como ocorrendo em três fases sequenciais: pulmonar, pró-inflamatória e protrombica. Na fase pulmonar, o SARS-CoV-2 infecta as células-alvo do hospedeiro e causa pneumonia intersticial e SDRA por meio da regulação negativa da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA₂) e um desequilíbrio do sistema renina-angiotensina (SRA) (NI *et al.*, 2020). Na fase pró-inflamatória, as células alvo infectadas e os linfócitos respondem ainda à infecção por SARS-CoV-2 pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias, resultando em LPA e tempestade de citocinas via inflamação sistêmica. Na fase final protrombica, ocorre agregação plaquetária generalizada e trombose dando origem a coagulopatia e podendo ocorrer falência de múltiplos órgãos (LEE; CHOI, 2021).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel central em muitas infecções virais respiratórias, como na COVID-19, coordenando e ativando a resposta imune adaptativa e, portanto, são de grande importância na patologia da doença (CONTI *et al.*, 2020). Quando há uma resposta anti-inflamatória descontrolada, pode levar ao envolvimento do tecido pulmonar e a SDRA e/ou a uma resposta sistêmica atingindo múltiplos órgãos. O equilíbrio do sistema imunológico pode levar à eliminação da doença com efeitos colaterais mínimos, enquanto o desequilíbrio pode levar a danos nos tecidos (GHAZAVI *et al.*, 2021).

3.3.3 Multiresistência antimicrobiana e LPA/SDRA

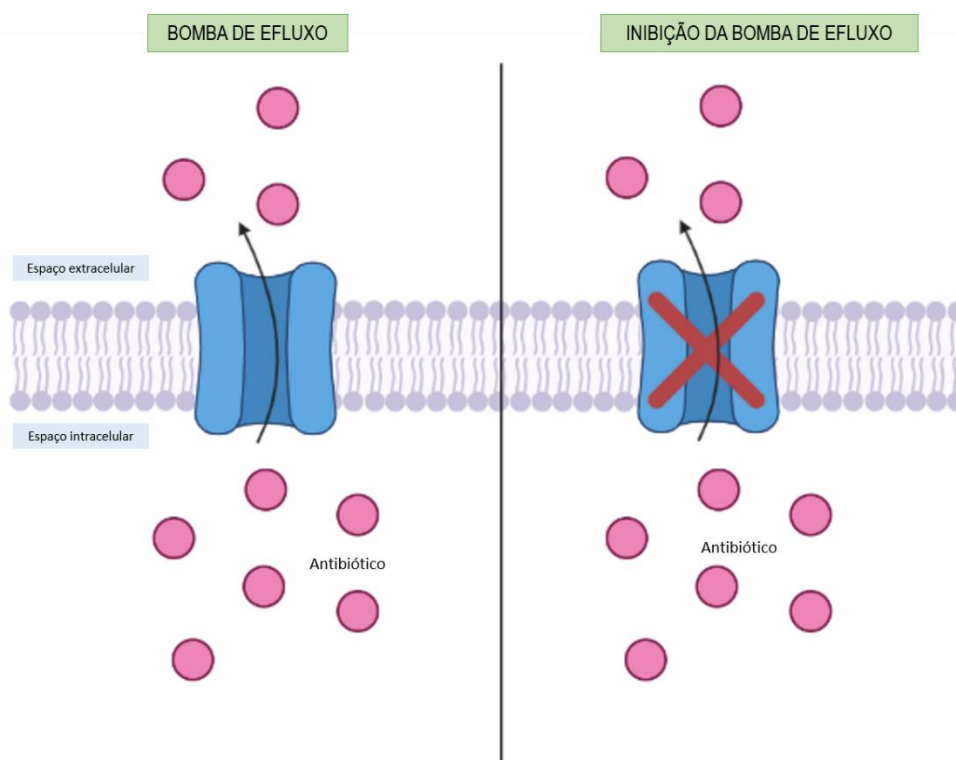
A infecção pulmonar é uma das principais complicações que ocorrem em pacientes com SDRA em ambientes nosocomiais, aliada a fatores de risco tradicionais e a desregulação das defesas imunológicas pulmonares. As infecções bacterianas mais comuns em pacientes com ventilação mecânica são por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (LUYT *et al.*, 2020), além leveduras como algumas

espécies de *Candida* (CHOWDHARY; SHARMA, 2020).

Nesse contexto, o principal problema no tratamento de infecções microbianas causadas por bactérias Gram-negativas e por fungos é sua resistência aos antimicrobianos, tornando o manejo clínico das infecções pulmonares causadas por tais patógenos um desafio para os médicos e a magnitude do problema de saúde global é enorme (CILLÓNIZ; DOMINEDÒ; TORRES, 2019).

O efluxo de antibióticos é um mecanismo utilizado pelas bactérias para bombear antibióticos de dentro de suas células para o ambiente externo, para tal, as mesmas utilizam as bombas de efluxo, que são proteínas transportadoras especiais (Figura 5). Em um momento, onde a oferta de novos antibióticos diminui e a resistência bacteriana aumenta, portanto inibir essas bombas pode ser uma alternativa atrativa (SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019). Os inibidores da bomba de efluxo (EBIs) são moléculas capazes de inibir o efluxo das drogas para fora da célula bacteriana e têm sido considerados potenciais agentes terapêuticos que podem restaurar a atividade de antibióticos que já perderam sua atividade contra bactérias (ALMATAR *et al.*, 2021).

Figura 5 - Esquema do mecanismo de resistência bacteriana Bomba de efluxo e a sua inibição.



Fonte: a autora.

As proteínas de efluxo estão presentes em todas as membranas bacterianas, elas reconhecem e expulsam ativamente antibióticos, corantes e outros compostos tóxicos das células, impedindo que esses compostos atinjam as concentrações citoplasmáticas necessárias para exercer seus efeitos. As proteínas de efluxo podem ser específicas para apenas um substrato, ou podem transportar compostos quimicamente não relacionados, conferindo resistência a múltiplas drogas. Dentre as bombas de efluxo, a NorA, desempenha um papel muito importante nos mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* e é considerada o sistema de resistência a múltiplas drogas mais eficiente (MONTEIRO; DE AQUINO; MENDONÇA JUNIOR, 2020).

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um patógeno humano em que a atividade da bomba de efluxo leva a altos níveis de resistência a antibióticos e representa um desafio terapêutico clínico (BHATTACHARJEE *et al.*, 2022). Outra cepa de *Staphylococcus aureus*, IS-58, possui a bomba de efluxo Tet(K) responsável pela extração ativa da tetraciclina da célula para o meio extracelular, proporcionando proteção às bactérias (FIGUEREDO *et al.*, 2021).

Algumas bactérias patogênicas altamente resistentes, agrupadas sob a sigla ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Escherichia coli*), estão relacionados à resistência antimicrobiana associada à assistência à saúde (REZA *et al.*, 2019; SEUKEP *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020). Esses microrganismos provaram ser desafiadores para tratar, devido à sua capacidade intrínseca e adquirida de desenvolver rapidamente mecanismos de resistência em resposta a ameaças ambientais (REZA *et al.*, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou esses como patógenos prioritários para pesquisas e aprimoramento de antibióticos novos e eficientes (SEUKEP *et al.*, 2020).

Os patógenos do grupo ESKAPEE, constituídos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, são a principal causa de infecções nosocomiais com risco de vida (YU *et al.*, 2020). Diante do contexto da LPA/SDRA nos ambientes hospitalares e o crescente aumento de microrganismos com multirresistência aos antimicrobianos disponíveis, o desenvolvimento de fármacos com propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana poderia ser de grande interesse para a indústria farmacêutica.

3.3.4 Modelo de Lesão Pulmonar Aguda Induzida por Lipopolissacarídeos (LPS)

A causa mais comum da LPA é a infecção bacteriana, sendo os lipopolissacarídeos (LPS) endotoxinas das bactérias Gram-negativas sugeridos como patógenos importantes responsáveis por essa inflamação. A LPA é uma doença pulmonar inflamatória predominantemente caracterizada por produção exagerada de mediadores pró-inflamatórios, infiltração de células inflamatórias e apoptose de células epiteliais alveolares (LIU *et al.*, 2016; SURESHBABU *et al.*, 2016; UEKI *et al.*, 2018).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina bacteriana que ativa os receptores tipo Toll-like 4 (TLR4) nos macrófagos e estimula o recrutamento das proteínas citoplasmáticas MyD88 (resposta primária da diferenciação mielóide 88) e TRIF adaptadoras (interferon- β indutor de adaptador que contém o domínio TIR) (HARIKRISHNAN *et al.*, 2018). A LPA induzida por altos níveis de LPS, ocorre frequentemente por sepse com uma manifestação precoce da falência múltipla dos órgãos. Assim sendo, vários estudos revelaram que a resposta inflamatória induzida pelo LPS é essencial para a progressão da LPA. O LPS ativa o receptor TLR-4 que inicia uma cascata de sinalização envolvendo MyD88 e TRIF, levando à fosforilação de NF- κ B (factor nuclear kappa B) e produção de várias citocinas inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (ZENG *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2020).

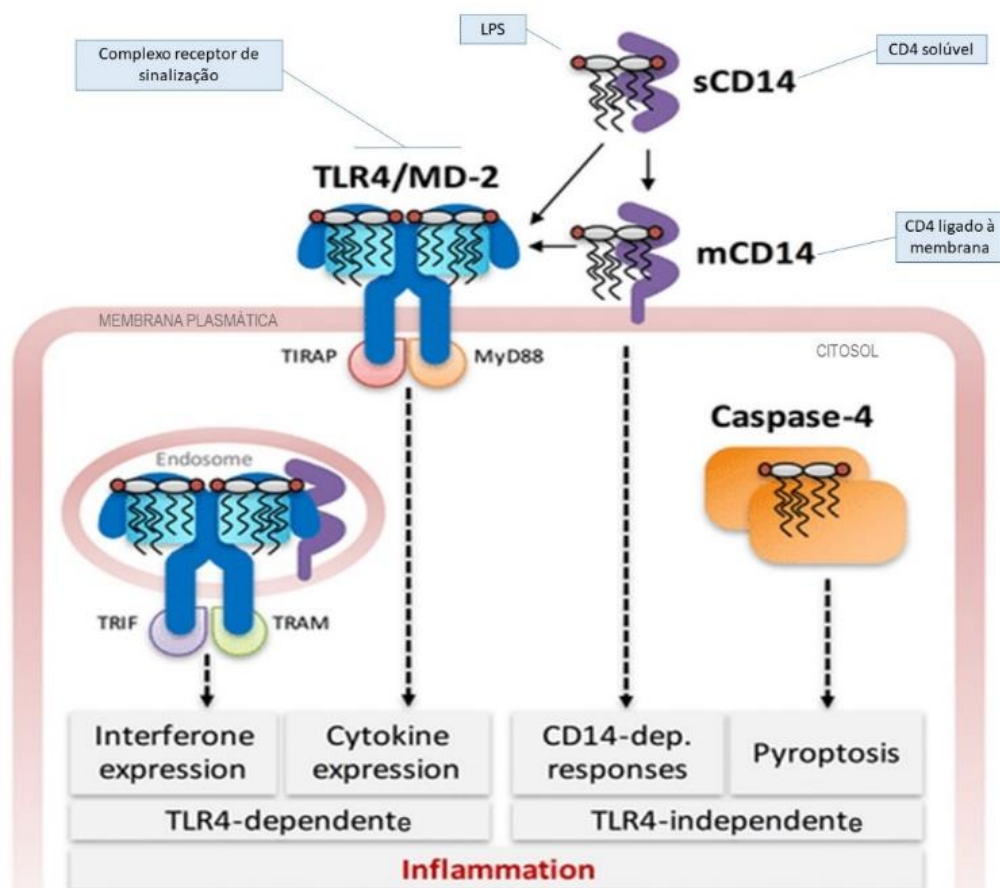
O CD14 é uma glicoproteína que atua como receptor de microrganismos que reconhece diferentes estruturas de LPS, um co-receptor para vários receptores do tipo Toll (TLRs) que transferem os produtos da parede celular bacteriana para os TLRs e ativam a cascata de sinalização tanto na superfície da célula quanto no compartimento endossomal e desencadeiam a reação do sistema imunológico inato após agravos como infecção ou lesão e consequente dano celular (WU *et al.*, 2019).

Os CD14 podem ser encontrados de duas formas: ligado à membrana (mCD14) na superfície de monócitos, macrófagos e neutrófilos ou na forma de CD14 solúvel (sCD14). O sCD14 inibe as respostas celulares, desviando LPS de mCD14 e promovendo o efluxo de LPS de mCD14 da superfície celular transferindo-o para as lipoproteínas plasmáticas. O sCD14 tem efeitos anti-inflamatórios sistêmicos e nos tecidos pode ter efeitos pró-inflamatórios que aumentam a resistência às bactérias

(RANF, 2016).

A figura 5 mostra o mecanismo de atuação do LPS. O CD14 (principal receptor do LPS) transfere o LPS para o complexo TLR4/receptor MD-2 residente na membrana, inicia a sinalização intracelular e desencadeia sequencialmente duas cascatas de sinalização: a primeira envolvendo as proteínas adaptadoras TIRAP e MyD88 que é induzida na membrana plasmática e a segunda que envolve as proteínas adaptadoras TRAM e TRIF no endossomo após endocitose do receptor. Portanto, o curso das respostas pró-inflamatórias induzidas por LPS depende estritamente das taxas de endocitose de TLR4 e tráfego através do compartimento endolisossomal. Dependendo da localização celular (na membrana plasmática ou em endossomos após endocitose dependente de CD14), os complexos TLR4/MD-2/LPS ativam a produção de interferons ou citocinas por meio de adaptadores de sinalização distintos (TIRAP/MyD88 ou TRIF/TRAM). Intracelular ocorre à oligomerização da caspase-4, ativação do inflamassoma não canônico e morte celular piroptótica (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021; RANF, 2016).

Figura 6 - Esquema mostrando o mecanismo de atuação do LPS.



Fonte: adaptado de (RANF, 2016).

3.3.5 Terapia da LPA/SDRA

Com o advento da pandemia do novo coronavírus e a instauração da COVID-19 na realidade da vida atual, a corrida por uma terapia para a LPA/SDRA está cada vez mais necessária, já que devido à complexidade da LPA/SDRA, não há terapia eficiente disponível (TARIGHI *et al.*, 2021).

A ventilação pulmonar mecânica é um método terapêutico padrão para pacientes com SDRA, no entanto, pode levar ao biotrauma, aumentando a inflamação pulmonar e piorando a condição clínica devido à lesão pulmonar induzida por ventilação (WANG *et al.*, 2017). A ventilação pulmonar também pode ser complementada por medicamentos anti-inflamatórios, a exemplo dos corticosteroides que são considerados valiosos para o tratamento, como um importante agente anti-inflamatório (KELLNER *et al.*, 2017). Os corticosteroides suprimem a inflamação pulmonar, mas também inibem as respostas imunes e dificulta a eliminação do patógeno (RUSSELL; MILLAR; BAILLIE, 2020).

A eritropoietina, pode ter efeitos protetores contra LPA/SDRA induzida por vírus e outros patógenos, exerce propriedades antiapoptóticas e citoprotetoras, além de promover a produção de células progenitoras endoteliais e reduzir os processos inflamatórios por meio da inibição das vias de sinalização do fator nuclear κB (NF- κB) e JAK-STAT3 (SAHEBNASAGH *et al.*, 2020).

Um estudo realizado com exossomos derivados de células-tronco demonstrou uma promessa para a terapia baseada em células na clínica devido às funções anti-inflamatória, remodelação alveolar e prevenção de fibrose, embora mais pesquisas sejam necessárias para determinar totalmente o uso desta terapia em aplicações clínicas (XU *et al.*, 2020a).

Muitas pesquisas apontam para o uso de antibacterianos e antivirais em pacientes com COVID-19 e SDRA moderada a grave, porém, esse tratamento pode não ter um efeito significativo na sobrevida hospitalar desses pacientes, uma vez que a SDRA apresenta altas taxas de mortalidade (LIU *et al.*, 2020). Outras apontam para o uso rotineiro de antibióticos para fins imunomoduladores na SDRA e em outras doenças inflamatórias, uma das limitações é o desenvolvimento de resistência aos antibióticos (SAUER *et al.*, 2021).

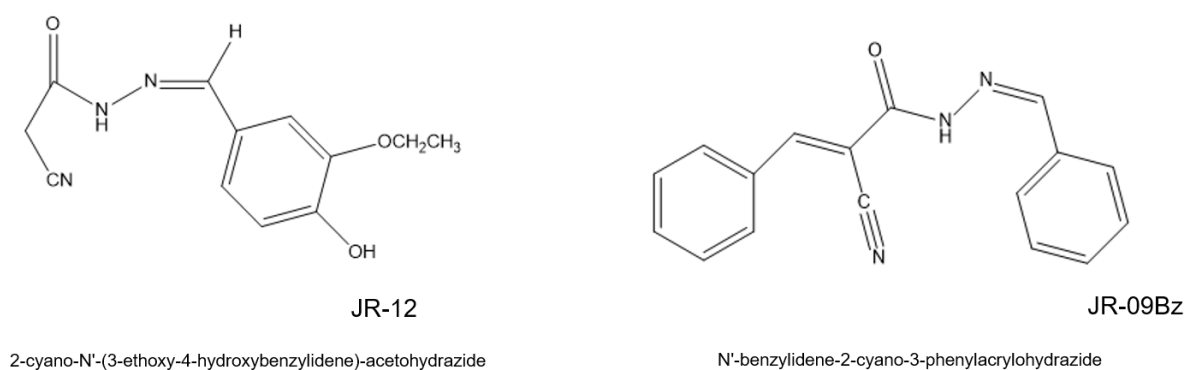
O estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da LPA e da SDRA, o processo é complexo e várias vias estão envolvidas. No entanto, espera-se que enfrentar a superprodução de ROS e a diminuição da capacidade de defesa durante a LPA/SDRA possa abrir um novo campo de abordagens terapêuticas para uma doença que não teve avanços significativos, apesar de 50 anos de investigações (KELLNER *et al.*, 2017). Nesse contexto, acilhidrazonas podem ser consideradas estruturas privilegiadas para o desenho de compostos bioativos com atividade anti-inflamatória (MORAES *et al.*, 2018).

4 MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS *N*-ACILHIDRAZÔNICOS SUBSTITUÍDOS

Os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos foram sintetizados, caracterizados e cedidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, de acordo com as técnicas desenvolvidas e padronizadas por este laboratório. Para a obtenção dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos, o LSVM usou como estrutura base os derivados JR-12 e JR-09Bz (Figura 6) com diferentes substituições, na intenção de ampliar o leque de novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios, cujas metodologias referentes à obtenção desses compostos e comprovação de atividade anti-inflamatória encontram-se descritas em SILVA (2015).

Figura 7 - Estrutura química dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-12 e JR-09Bz



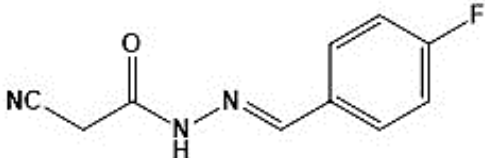
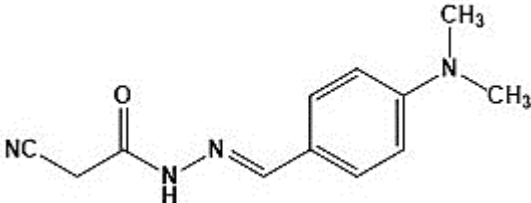
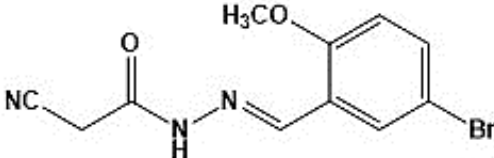
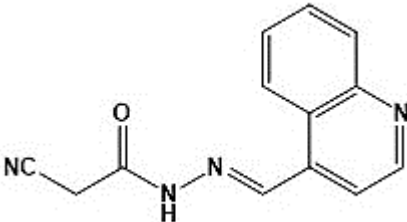
Fonte: (SILVA, 2015)

4.1.1 Novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos

A nomenclatura e estruturas química dos derivados *N*-acilhidrazônicos

utilizados neste se encontram descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos.

Composto	Nomenclatura	Estrutura molecular
JR-13	(<i>E</i>)-2-ciano- <i>N'</i> -(4-fluorobenzilideno)acetohidrazida	
JR-15	(<i>E</i>)-2-ciano- <i>N'</i> -(4-(dimetilamino)benzilideno)acetohidrazida	
JR-17	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-2-cianoacetohidrazida	
JR-18	(<i>E</i>)-2-ciano- <i>N'</i> -(quinolin-4-il-metileno)acetohidrazida	

4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Atividade Antimicrobiana

4.2.1.1 Microrganismos

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos foram utilizados microrganismos provenientes de duas coleções, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) e da coleção de culturas da *Micoteca University Recife Micology* (URM), sendo alguns destes isolados de amostras clínicas. As espécies utilizadas foram escolhidas por estarem relacionadas ao trato respiratório e / ou as infecções hospitalares.

Foram utilizadas as seguintes espécies de bactérias: *Acinetobacter baumannii* UFPEDA1025B, *Enterobacter aerogenes* UFPEDA348, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396, *Micrococcus luteus* UFPEDA06, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina UFPEDA709, sendo esta última, isolado de amostra clínica. Foram testadas também as espécies de leveduras *Candida albicans* UFPEDA1007, *Candida guilliermondii* URM6403 e *Candida albicans* URM4664, sendo estas duas últimas, isoladas de amostras clínicas.

Nos ensaios de inibição da bomba de efluxo foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus*: RN4220 que superexpressa a proteína de efluxo MsrA; IS-58, que superexpressa a proteína de efluxo Tet(K); SA1199B, que superexpressa a proteína de efluxo NorA e a cepa selvagem SA1199, referente a mesma. As cepas foram fornecidas pelo Prof. S. Gibbons (University of London) e foram cultivadas por 24h antes dos experimentos a 37 °C em meio sólido Brain Heart Infusion (BHI) - Agar (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.). Esses ensaios foram realizados em parceria com a Universidade Regional do Cariri (URCA).

4.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM)

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) /

Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18, diluídos em água esterilizada, através da metodologia de microdiluição em caldo de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M100 CLSI 2017 para bactérias e M27 CLSI 2017 para fungos. Cada derivado *N*-acilhidrazônico em estudo, na concentração inicial de 1000 µg/mL, foi adicionado à placa de 96 poços contendo meio, na sequência, foram feitas diluições sucessivas até concentração final de 0,98 µg/mL. Em seguida, uma alíquota de uma suspensão microbiana padronizada na concentração correspondente a 0,5 da escala de McFarland foi adicionada aos poços da placa, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para as cepas bacterianas e $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL para as cepas de leveduras foi adicionada na placa, para uma concentração final $1,5 \times 10^5$ UFC/mL e $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL respectivamente. A placa foi incubada por 24 horas a fim de determinar a CIM, que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro* após o período de incubação. Para análise quantitativa do crescimento microbiano, foi adicionado 0,01 mg/mL resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) a todos os poços, seguidos de incubação por 1 hora e posterior leitura das placas (STOPPA *et al.*, 2009). Para a determinação da CBM/CFM, menor concentração capaz de inibir 99,9 % do crescimento microbiano, foi repicada uma alíquota (10 µL) das concentrações que apresentaram atividade na placa do CIM. Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foi considerada como bactericida/fungicida a menor concentração dos compostos onde não houve crescimento sobre a superfície do Agar Mueller Hinton para bactérias e Agar Batata Dextrose para fungos.

4.2.1.3 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio.

Um estudo comparativo entre o efeito do inibidor padrão das bombas de efluxo foi utilizado para avaliar os efeitos dos compostos frente à CIM dos antibióticos testados e do brometo de etídio (EtBr) de acordo com Tintino *et al.* (2020). Os inibidores padrão utilizados foram o CCCP (Cianeto de Carbonila *m*-Clorofenil-Hidrazona) e CPMZ (Clorpromazina). A avaliação do efeito dos derivados *N*-

acilhidrazônicos (JR-15, JR-17 e JR-18) sobre as bombas de efluxo foi testada usando uma concentração sub-inibitória (CIM/8) tanto dos compostos quanto dos inibidores. O brometo de etídio é um corante intercalante de DNA que funciona neste método ligando-se ao DNA do patógeno a ele exposto e emitindo luz. Caso contrário, quando o sistema de efluxo está presente, sua atividade é inibida e nenhuma luz é emitida. A CPMZ e o Brometo de Etídio (EtBr) foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto o CCCP foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). Nos experimentos, 150 µL de inóculo bacteriano em solução salina, correspondente a 0.5 da escala de McFarland, foram adicionados juntamente com os inibidores e com os derivados *N*-acilhidrazônicos (CIM/8) e completados com BHI até atingir o volume de 1,5 mL de solução. Este foi transferido para placas de microdiluição de 96 poços, as quais foram microdiluídas com 100 µL do antibiótico testado ou do EtBr em diluições seriadas (1:1) que variaram de 1024 a 1 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e o crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de 20µL de uma solução de resazurina a 0,01 %. O resultado foi interpretado pela mudança de coloração após a adição de resazurina, a cor azul indica ausência de células viáveis e a cor rosa indica a presença de células viáveis. Placas para controle foram preparadas utilizando apenas inóculo e BHI, sendo realizada a microdiluição seriada com o antibiótico testado e com o EtBr.

Devido a falta de insumos para a síntese do JR-13 causada pela Pandemia do COVI-19, os testes de bomba de efluxo não foram realizados com o derivado JR-13.

4.2.2 Atividade Hemolítica

Para a avaliação da atividade hemolítica, foram utilizados camundongos Swiss provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os camundongos foram anestesiados com cetanima e xilazina, e a coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, sendo as amostras transferidas para tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante e armazenadas a 4° C antes do uso. Alíquotas de 3 mL da amostra de sangue total foram diluídas em 300 mL de solução salina (0,85% NaCl + CaCl₂ 100 mM) sob agitação magnética. Após a diluição inicial, a mistura foi separada em tubos Falcon e

centrifugados a 300 rpm por 5 min e o sobrenadante resultante foi removido e adicionado 30 mL de solução salina (lavagem) e centrifugados novamente. Essa etapa de centrifugação e lavagem foi repetida 3 vezes. Após a última etapa de lavagem, o volume de eritrócitos em solução salina foi diluído de modo a obter uma solução com concentração final de 2% (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002). Os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 foram testados em placa de 96 poços, em triplicata e em diluições sucessivas a partir de 500 µg/mL até 3,9 µg/mL. A solução salina (0,85% NaCl + CaCl₂ 100 mM) foi usada como controle negativo, a solução 1 % TritonX-100 como controle positivo e o PBS como branco (diluente). As concentrações finais foram obtidas adicionando aos poços 100 µL da SE em cada poço. A placa foi selada e incubada durante 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente. Por fim, os sobrenadantes de todos os poços da placa foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e foi realizada a leitura da densidade óptica do sobrenadante no espectrofotômetro de placas com filtro de 540 nm modificado GRECO *et al.*, 2020. A porcentagem de hemólise foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{(\text{absorbância do teste}) - (\text{absorbância do diluente})}{(\text{absorbância do controle positivo}) - (\text{absorbância do diluente})} \times 100 \quad (\text{eq.1})$$

4.2.3 Citotoxicidade

4.2.3.1 Linhagens celulares e cultivo

As linhagens celulares utilizadas no teste de citotoxicidade foram L929 (fibroblastos murino) e J774 (macrófagos murino), cultivadas em meio de cultura DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Em todas, o meio de cultura, foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e adicionados 100 µg/mL de penicilina e estreptomicina e todas as culturas foram mantidas em estufa atmosférica

com 5 % de CO₂. As linhagens celulares foram provenientes do Banco de Células mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Para a coleta dos macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos BALB/c (8–10 semanas de idade) adquiridas no biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil e alojados a 20 – 25° C com 40 – 60% de umidade, um ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso a água e ração *ad libitum*. O isolamento dos macrófagos peritoneais foi realizado conforme descrito por Montoya *et al.* (2019). Uma quantidade de 1 mL de meio tioglicolato estéril de 3,8% foi injetada por via intraperitoneal (i.p.) e três dias depois, os macrófagos foram coletados do peritônio com PBS. O lavado peritoneal foi centrifugado e o precipitado celular ressuspenso em meio DMEM para posterior contagem de células. As células coletadas foram centrifugadas, ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina e incubadas 2 hs em uma estufa de CO₂ umidificada.

4.2.3.2 Ensaio com Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliação de citotoxicidade.

A atividade citotóxica foi avaliada através do ensaio do MTT, que se baseia na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente no ciclo de Krebs e ativa nas mitocôndrias de células viáveis, de converter o sal tetrazólio, de cor amarela em cristais de formazan, de cor purpura (ALLEY *et al.*, 1988). As células foram plaqueadas a uma densidade 2×10^5 células/mL em placas de 96 poços em meio de cultura de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico, e incubadas a 37 °C, numa atmosfera de CO₂ a 5 %. Após a incubação de 24 horas para aderência das células, foram colocados 100 µL de meio DMEM, com as concentrações de 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL de cada um dos *N*-acilhidrazônicos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18), realizada em triplicata, exceto no controle, no qual foi acrescentado mais 100 µL de meio DMEM. A doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como fármaco padrão. As células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas a 37 °C, numa atmosfera a 5% de CO₂. Após cada intervalo, 25 µL de

solução do MTT (5 mg/mL) foram adicionados aos poços e as placas incubadas por mais 3 horas. Ao final desse período, o sobrenadante foi aspirado e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 560 nm em leitor por um leitor de placas. A porcentagem de proliferação/viabilidade celular foi calculada e comparada ao controle (100 % da viabilidade) (MONTROYA *et al.*, 2019).

4.2.4 Atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos

4.2.4.1 Dosagem de óxido nítrico e quantificação de citocinas em macrófagos murinos

Os macrófagos peritoneais murinos foram plaqueados a concentração de 3×10^5 células/mL, em placa de 96 poços com meio DMEM suplementado com 10 % de SFB e 1% de antibiótico e incubados a 37 °C, por 24 horas, para aderência. Após esse tempo, as células foram estimuladas com LPS (*Escherichia coli* 055: B5; Sigma, St. Louis, MO, USA), por 1 hora (5 µg/mL) e em seguida, tratadas com novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 por 24 horas, nas concentrações de 1,56, 6,25 e 12,5 µg/mL (concentrações estabelecidas através do ensaio de citotoxicidade com MTT), em triplicata de poços. A dexametasona (10 µg/mL) e *N*-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 25 µg/mL) foram usadas como controles positivos. Após 24 horas, recolheu-se 100 µL de sobrenadante celular para dosagem da concentração de nitrito/nitrato (indicativa da produção de óxido nítrico) pelo reagente de Griess, e 100 µl para a quantificação das citocinas, utilizando os kits comerciais de ELISA (Invitrogen, EUA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata (MONTROYA *et al.*, 2019).

Para determinação de NO, 100 µL do sobrenadante foi misturado com o reagente de Griess (100 µl) (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletlenodiamina em água; 1:1, Sigma) em uma placa de poços a parte, e foram incubados durante 10 min ao escuro. A concentração de nitrito foi

calculada com referência a uma curva padrão obtida usando NaNO_2 , utilizando-se uma diluição seriada 100 – 0 μL da solução padrão de nitrito de sódio preparada em DMEM. A absorbância foi medida em 540 nm utilizando um leitor de placas de Elisa Spectra Softmax (CAO *et al.*, 2018).

A dosagem da concentração de nitrito/nitrato também foi realizada no experimento *in vivo* de Lesão pulmonar aguda induzida por LPS em modelo animal, utilizando o sobrenadante do lavado broncoalveolar por essa metodologia descrita.

4.3 ENSAIOS *IN VIVO*

4.3.1 Animais

Para o experimento de toxicidade aguda, foram utilizados, camundongos adultos fêmeas, da linhagem swiss (*Mus musculus*), provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DANTI-UFPE). Além destes, foram utilizados camundongos adultos machos e fêmeas BALB/c, para o experimento de Lesão Pulmonar Aguda, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) todos pesando entre 25 e 30 g. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos de acordo com as normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS), de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob número 136/2019, e encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei

9.605 - art. 32 e decreto 3.179 - art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Em todos os métodos *in vivo*, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico: Cetamina (0,2 mL/100g + sobredose 0,2 mL/100g) e Xilazina (0,1 mL/100g + sobredose 0,1 mL/100g) por via intraperitoneal (i.p.).

4.3.2 Ensaio Toxicológico Não Clínico

O ensaio toxicológico não clínico foi baseado na OECD/OCDE - 423/2001 - *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity – Up-and - DownProcedure (UDP)*, com modificações. Foram utilizados dois grupos de três camundongos fêmeas pesando entre 25-30 gramas (g) para cada substância testada. Os animais foram selecionados aleatoriamente, marcados para permitir identificação individual, e mantidos em suas gaiolas por 5 dias antes do início do experimento para permitir a aclimação às condições do laboratório. Para alimentação, foi utilizado a dieta convencional do laboratório com fornecimento ilimitado de água potável *ad libitum*.

Após o período de jejum de 4 horas, os animais foram pesados e os derivados (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) foram administrados em dose única de 300 mg/Kg, por gavagem, de acordo com o peso corporal de cada animal. A dose escolhida foi de 300 mg/Kg de acordo com estudos anteriores com os *N*-acilhidrazônicos precursores JR-09Bz e JR-12 de SILVA (2019). Depois da substância ser administrada, o alimento foi retirado por mais 1-2 horas. Os animais foram observados individualmente durante a primeira hora após a administração, periodicamente durante as primeiras 24 horas (com especial atenção durante as primeiras quatro horas), e a partir de então, diariamente, por um total de 14 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados: efeitos na locomoção; comportamento (agitação, irritabilidade, atividade reduzida, sonolência); respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, diarreia, micção, piloereção, ptosis e mortalidade (MALONE; ROBICHAUD, 1962). A massa corporal individual dos animais foi mensurada diariamente, bem como o consumo de água e ração. As mudanças na massa corporal foram calculadas e registradas.

Ao término desse período, os animais foram anestesiados, com a finalidade de

ser coletado o sangue, através da via intracardíaca para a realização de exames hematológicos e bioquímicos, visando avaliar a possível toxicidade renal e hepática. Depois da coleta de sangue, os animais foram eutanasiados e seus órgãos (pulmão, coração, rins, baço, fígado e estômago) pesados e examinados macroscopicamente. Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, seguindo orientações da Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), a qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2 % (relaxante muscular), no intuito de diminuir a dor e o sofrimento.

Os parâmetros analisados foram: hemograma, ácido úrico, creatinina, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGO) e ureia. Para o hemograma o sangue foi acondicionado em tubos com EDTA e para as dosagens bioquímicas em tubos com gel separador. Os tubos com gel separador foram centrifugados por 10 min a 3000 rpm em macrocentrífuga (EV-LAB).

Os hemogramas foram realizados no Contador hematológico *ABX Pentra XL 80 Details – HORIBA* e a dosagem dos parâmetros bioquímicos foram realizadas no equipamento Metrolab 2300 PLUS (Wiener lab) pertencentes ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Universidade Estadual da Paraíba.

4.3.3 Lesão Pulmonar Aguda por LPS

Os camundongos BALB/c foram divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais, cada grupo com 8 animais, sendo 4 (quatro) fêmeas e 4 (quatro) machos em cada grupo. Inicialmente, os animais receberam solução salina, dexametasona ou a substância em estudo, por gavagem, e após 1 hora foi instilado por via intranasal 25 µL de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo 026:B6, Sigma Alderich) dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). Vinte e quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanasiados e o lavado bronqueoalveolar foi coletado para análise de migração leucocitária e dosagem de óxido nítrico (NO). O tecido pulmonar foi coletado para o estudo histopatológico e para a determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase, da produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico e citocinas (SANTOS *et al.*, 2018). As citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e

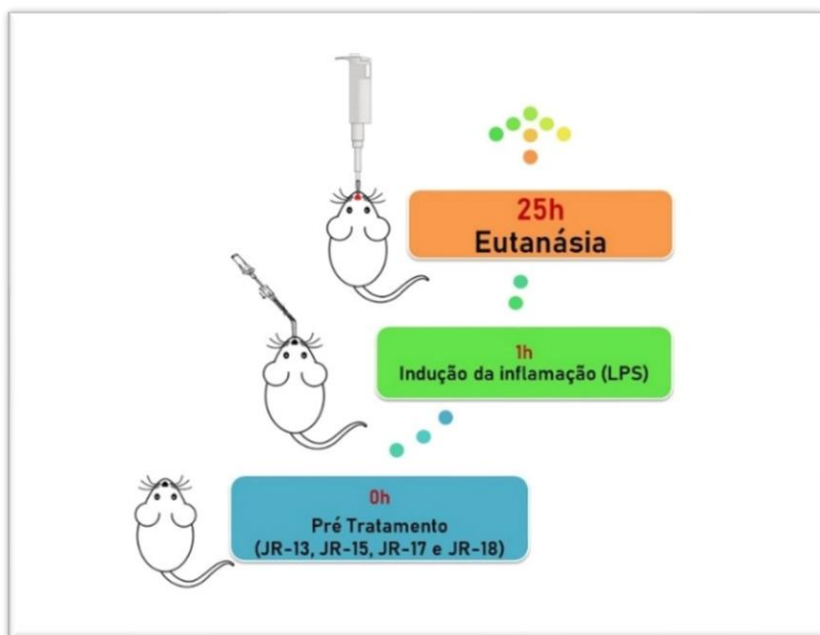
TNF- α foram dosadas utilizando os kits comerciais de ELISA (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os derivados *N*-acilhidrazônicos foram testados na dose de 10 mg/kg, baseado em resultados anteriores obtidos por nosso laboratório na pesquisa de SILVA (2019).

4.3.3.1 Desenho experimental

- **Grupo Sham:** recebeu 100 μ L de água por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de solução fisiológica (NaCl 0,9%) por via Intranasal (i.n.);
- **Grupo Controle negativo (LPS):** recebeu 100 μ L de água por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de LPS (25 μ g/25 μ L) por via Intranasal (i.n.);
- **Grupo Controle positivo (DEXA):** recebeu dexametasona (sigma) dissolvida em 100 μ L de água por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de LPS (25 μ g/25 μ L) por via Intranasal (i.n.);
- **Grupo JR-13:** recebeu 100 μ L de JR-13 (10 mg/kg) por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de LPS (25 μ g/25 μ L) por via Intranasal (i.n.);
- **Grupo JR-15:** recebeu 100 μ L de JR-15 (10 mg/kg) por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de LPS (25 μ g/25 μ L) por via Intranasal (i.n.);
- **Grupo JR-17:** recebeu 100 μ L de JR-17 (10 mg/kg) por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de LPS (25 μ g/25 μ L) por via Intranasal (i.n.);
- **Grupo JR-18:** recebeu 100 μ L de JR-18 (10 mg/kg) por gavagem uma hora antes da instilação de 25 μ L de LPS (25 μ g/25 μ L) por via Intranasal (i.n.);

Figura 8 - Esquema do experimento de LPA por LPS



Fonte: Elaborado pela autora

4.3.3.2 Contagem de Células do Lavado Broncoalveolar

Após eutanásia dos animais foi realizada a retirada do lavado broncoalveolar (LBA), utilizando a técnica de sucessivas aspirações com 1 mL de PBS (Solução tampão fosfato) utilizando uma cânula de polietileno intratraqueal. Em seguida, as células presentes no LBA foram contadas utilizando um contador automático (*Hematology Auto Analyse ABX Pentra 80*) e visualizadas em microscópio óptico e recontadas, utilizando a Câmara de Neubauer após a diluição na proporção de 1:20 com a solução de Türk (20 µL solução de Türk + 20 µL suspensão de células). Para a contagem diferencial de células, linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos, as amostras foram citocentrifugadas e coradas com Hematoxilina e eosina – H & E (Panótico Rápido – Laborclin), e contadas no microscópio óptico no aumento de 100x.

Após a contagem de células, foi calculada a porcentagem de inibição da inflamação dos grupos tratados com dexametasona e com os derivados *N*-acilhidrazônicos, através da seguinte equação:

$$Inib. da inflamação GRUPO (\%) = \frac{\bar{X}_{n^{\circ} \text{ de leucócitos } G \text{ INFLAMADO}} - \bar{X}_{n^{\circ} \text{ de leucócitos } GRUPO}}{\bar{X}_{n^{\circ} \text{ de leucócitos } G \text{ INFLAMADO}}} \times 100 \quad (\text{eq.2})$$

4.3.3.4 Histologia do pulmão

As amostras do pulmão foram preservadas por 24 horas em formaldeído a 10 % tamponado. Logo após, foram lavadas em água, imersas em álcool etílico 70 % durante 3 - 4 dias e incluídas em parafina. Os cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo e submetidos à técnica de coloração Tricrômico de Masson (TM). As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Eclipse E200, com câmera modelo HD Lite 1080P acoplada.

4.3.3.5 Imunohistoquímica

Primeiramente, cinco cortes (5 µm de espessura) do tecido pulmonar de cada grupo (Salina, LPS, DEXA, JR17 e JR18) foram realizados e aderidos a lâminas tratadas com 3-amino-propil-trietoxi-silano (APES, Sigma, EUA). Os cortes foram desparafinizados com xileno e reidratados em etanol graduado (100 a 70%). Posteriormente, os cortes foram processados com o kit Dako EnVision™ FLEX+ (K8002, Dako Laboratories, Carpinteria, CA) antes da incubação os anticorpos anti-COX-2 (ab15191, Abcam, Cambridge, UK) diluído 1:100 e anti-iNOS (ab3523, Abcam, Cambridge, UK) diluído 1:20 foram preparados com Dako Antibody Diluent (K8006). Após marcação, os cortes foram contra corados com hematoxilina. A marcação de COX-2 e iNOS foi confirmada por coloração acastanhada no citoplasma. As lâminas foram analisadas quantitativamente através da densidade de pixels, usando o software Gimp 2.6 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX), totalizando 5 microfotografias por grupo. As amostras foram processadas e analisadas no

Laboratório de Ultraestrutura da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães.

As análises de imunohistoquímica foram realizadas apenas nas amostras biológicas (pulmão) dos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos JR-17 e JR-18, por apresentarem resultados mais relevantes na porcentagem de inibição da inflamação.

4.3.3.6 Determinação dos níveis de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada segundo protocolo descrito por Bradley; Christensen; Rothstein (1982) com modificações e utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares. Os fragmentos do pulmão (250 mg/mL) foram homogeneizados em solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM. Em seguida, o homogenato foi centrifugado em 8.300 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 1,9 mL da solução de reação (cloridrato de o-dionisidina - 0,167 mg/mL, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e peróxido de hidrogênio 0,0005 %). Logo após a incubação, a reação foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm, durante seis minutos, com variação do primeiro e do sexto minuto sendo consideradas. Os resultados foram expressos como unidade de mieloperoxidase por miligrama de tecido (MPO/mg de tecido).

4.3.3.7 Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

O grau de peroxidação lipídica no tecido pulmonar foi estimado pela determinação dos níveis de malondialdeído através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando o método descrito por Yargıçoğlu *et al.*, 1999 com algumas modificações. Os fragmentos de pulmão foram homogeneizados (250 mg/mL) em tampão fosfato 150 µM (pH 7,4). Após homogeneização, 63 µL do

homogenato foram colocados em microtubos tipo eppendorf, seguido da adição de 100 µL de ácido perclórico a 35 %. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, 150 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos microtubos e adicionado 50 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,2 %. A mistura foi levada ao banho de água fervente (95 °C/30 minutos). Após as amostras esfriarem, foram colocadas em uma placa de 96 poços e a leitura realizada em um leitor de microplacas (535 nm). A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em micromol de MDA/mg de tecido.

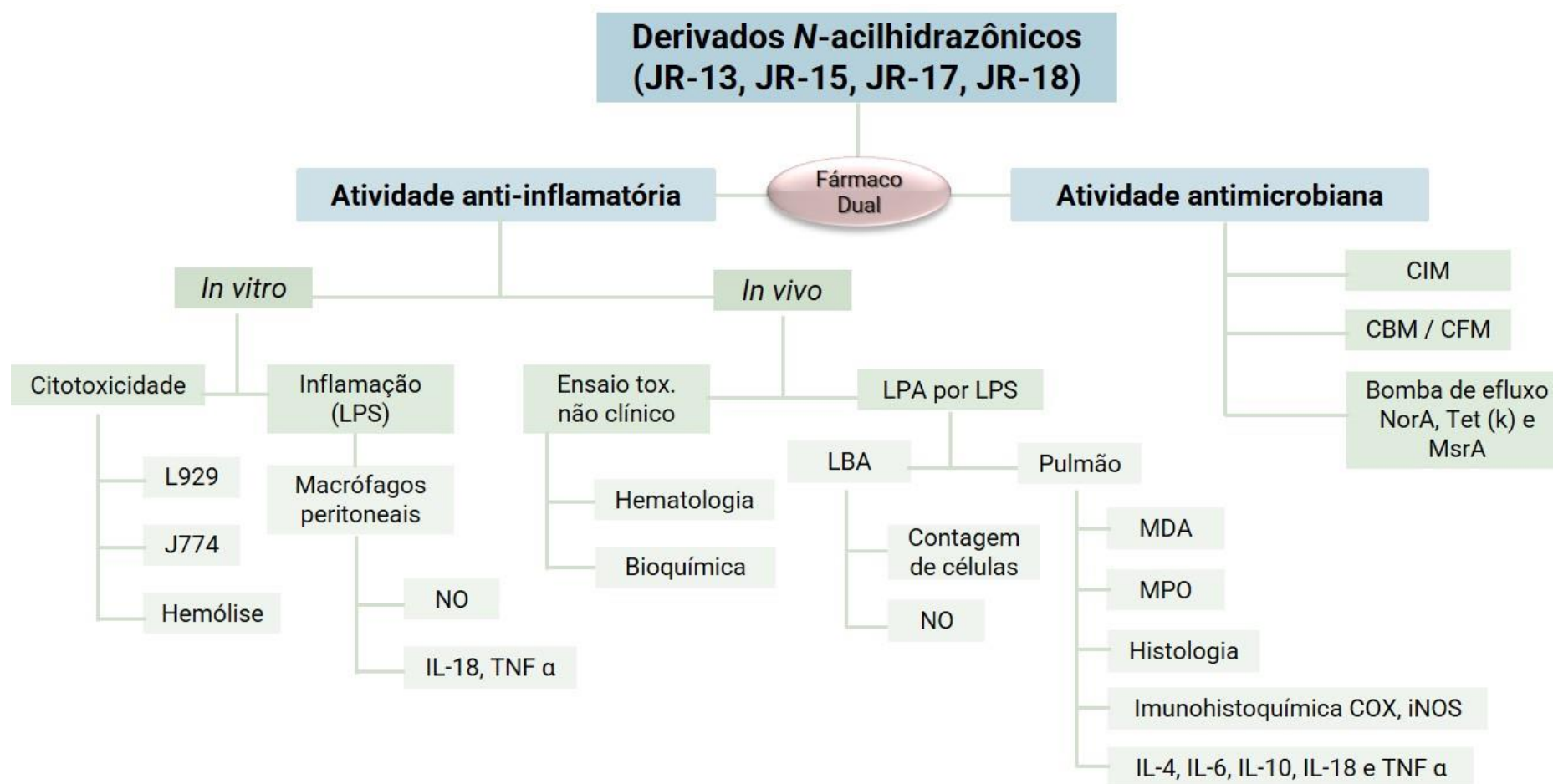
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo *GraphPad Prism* versão 8.0 para Windows (*GraphPad Software*, La Jolla, California USA). Foi utilizado a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão (n=6/grupo). Foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4.5 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A figura 9 mostra o fluxograma com o delineamento detalhado de todos os passos da pesquisa em ordem de realização.

Figura 9 - Fluxograma com o delineamento da pesquisa.



Fonte: a autora.

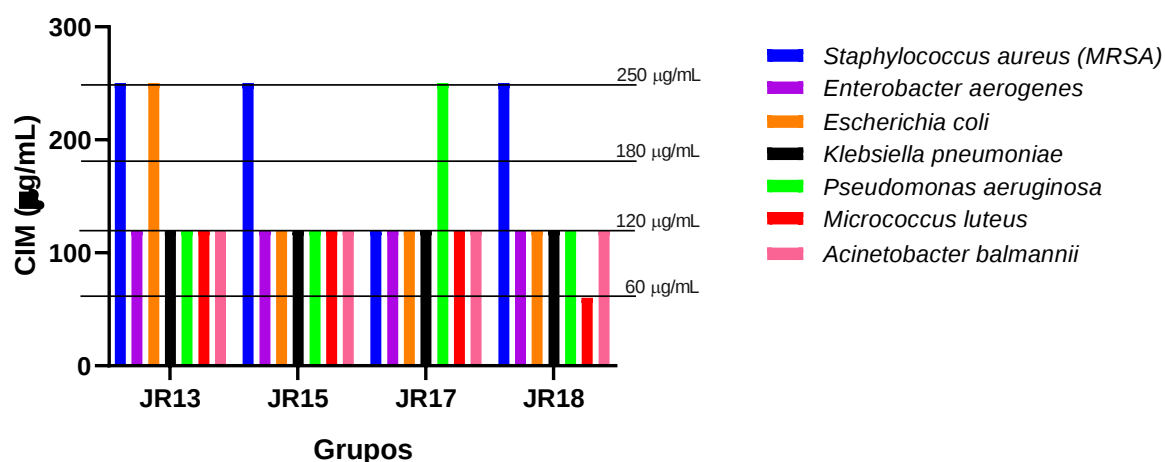
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

5.1.1 Atividade Antimicrobiana

Os valores da CIM dos derivados *N*-acilhidrazônicos estão dispostos na Figura 10 e da CBM na Figura 11.

Figura 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas bacterianas.



De maneira geral, os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos, apresentaram atividade antibacteriana para as cepas testadas com a CIM entre 60 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$, mostrando um bom espectro de ação antibacteriana.

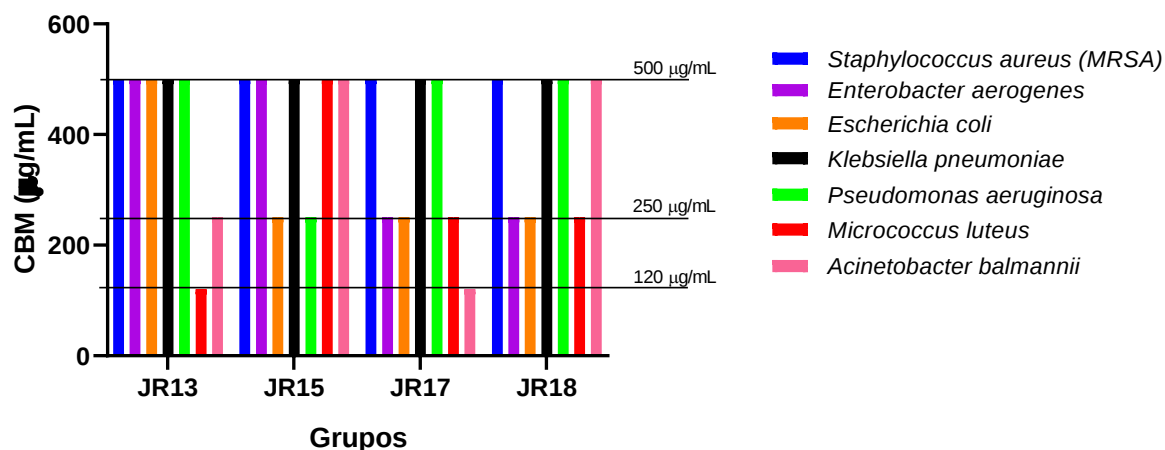
O derivado *N*-acilhidrazônico JR-17 apresentou atividade para a maioria das cepas testadas com CIM de 120 $\mu\text{g/mL}$, exceto para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que esse derivado apresentou atividade com CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$. Os derivados JR-13, JR-15 e JR-18 mostraram atividade frente a *P. aeruginosa* com CIM de 120 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados são significativos, já que a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa reconhecida como um patógeno oportunista

mais comumente associado a infecções nosocomiais e pneumonia de tratamento difícil devido à capacidade desta bactéria de resistir a muitos antibióticos atualmente disponíveis (PANG *et al.*, 2019).

Os patógenos prioritários da OMS, ESKAPEE, são a principal causa de infecções nosocomiais com risco de vida (RAJPUT *et al.*, 2021). Notavelmente, a inibição do crescimento de vários organismos Gram-negativos resistentes a medicamentos incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes* são enormemente complicadas. Por sua vez, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), exemplo de bactérias Gram-positivas, também é muito de para tratar (MOHANRAM; BHATTACHARJYA, 2016).

Nesse contexto, pode-se ressaltar também o resultado da CIM, frente a outras cepas normalmente associadas a infecções nosocomiais como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Todos os derivados N-acilhidrazônicos apresentaram a CIM de 250 µg/mL, frente à cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, exceto a JR-17 que mostrou atividade em 120 µg/mL. Frente à cepa de *Escherichia coli*, todos os derivados N-acilhidrazônicos apresentaram CIM de 120 µg/mL, exceto a JR-13 com CIM de 250 µg/mL. Em destaque, o espectro de atividade de todas as moléculas testadas diante a cepa de *Klebsiella pneumoniae* foi em torno de 120 µg/mL.

Figura 11 - Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL dos novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas bacterianas.

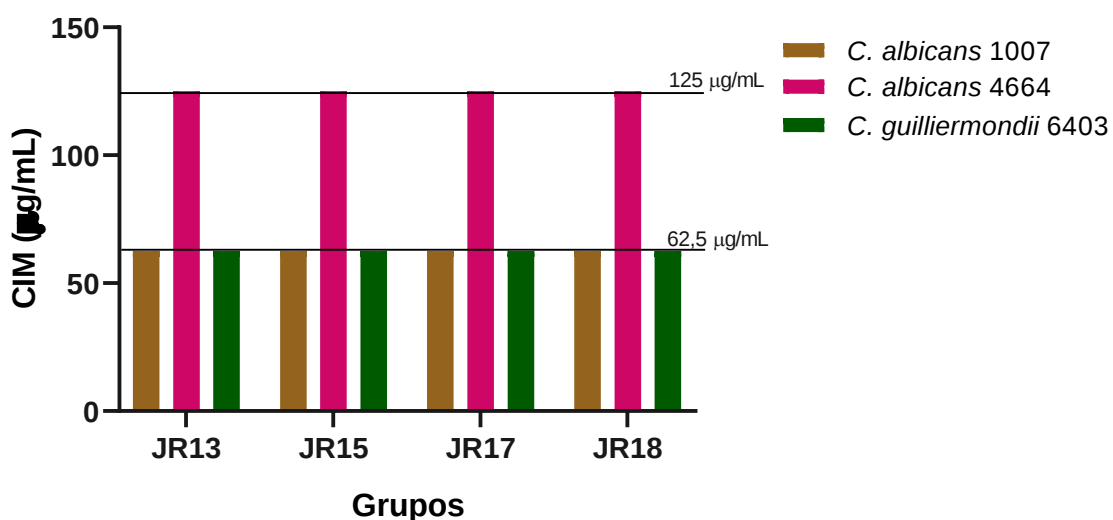


Entre todos os casos de pneumonia hospitalar na Europa, o *Staphylococcus aureus* é o segundo patógeno mais prevalente com 17,8% dos casos e 29,9% dos isolados são resistentes à metilina (CABRERA *et al.*, 2020). A CBM variou entre 120 µg/mL a 500 µg/mL, para a maioria dos derivados *N*-acilhidrazônicos e cepas bacterianas testadas.

A atividade antibacteriana dos derivados *N*-acilhidrazônicos testados neste estudo, corroboram com os dados de Moura (2018), o qual enfatiza a estrutura química dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos, mostrando que, a presença de nitrogênio na molécula do JR-15, a presença do bromo ligado ao anel benzênico no composto JR-17 e a presença de compostos heteroaromáticos nitrogenados fusionados ao anel benzênico no composto JR-18 são favoráveis à atividade biológica dos mesmos.

Além das bactérias citadas, os derivados *N*-acilhidrazônicos também foram testados *in vitro* frente às cepas de leveduras identificadas como *Candida albicans* UFPEDA1007, *Candida guilliermondii* UFPEDA6403 e *Candida albicans* URM4664 partindo da concentração 1000 µg/mL até 0,98 µg/mL. Os valores da CIM estão dispostos na Figura 12 e da CFM na Figura 13.

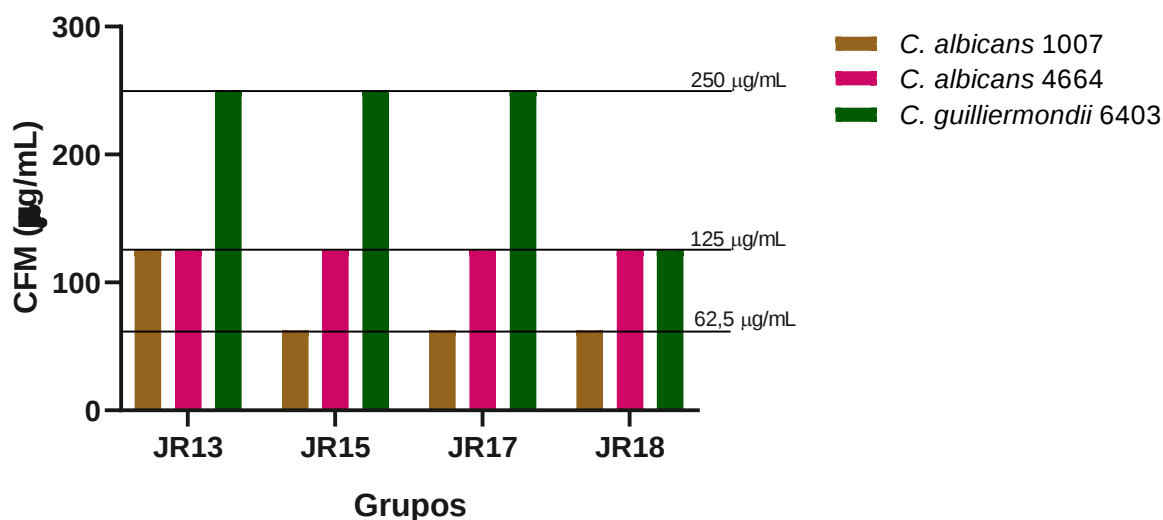
Figura 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas de leveduras.



Do mesmo modo, os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos, também apresentaram uma boa atividade antifúngica para as cepas de leveduras testadas com a CIM variando entre 62,5 µg/mL a 125 µg/mL.

Diante da cepa de levedura *C. albicans* 4664, todos os derivados *N*-acilhidrazônicos testados apresentaram CIM de 125 µg/mL. Em relação às outras duas cepas de leveduras testadas na pesquisa, *C. albicans* 1007 e *C. guilliermondii* 6403, todos os derivados *N*-acilhidrazônicos testados apresentaram atividade semelhante com CIM de 62,5 µg/mL. As cepas *C. albicans* 4664 e *C. guilliermondii* 6403 foram oriundas de isolados clínicos, que normalmente apresentam resistência a um número maior de antifúngicos, devido ao uso indiscriminado e prolongado de antifúngicos (PINTO *et al.*, 2019). Esses resultados são significativos uma vez que pacientes com COVID-19 em estado crítico, podem aumentar a suscetibilidade à infecção oportunista por *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* (MOSER *et al.*, 2021).

Figura 13 - Concentração fungicida mínima (CFM) em µg/mL dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 frente às cepas de leveduras.



A CFM do derivado *N*-acilhidrazônico JR-13 para a cepa *C. albicans* 1007 foi de 125 µg/mL. Já os outros derivados JR-15, JR-17 e JR-18, a CFM foi de 62,5 µg/mL sendo igual a CIM destes para a cepa *C. albicans* 1007. Diante do isolado clínico *C. albicans* 4664, a CFM de todos os derivados *N*-acilhidrazônicos foi de 125 µg/mL igual a CIM. Em relação ao isolado clínico *C. guilliermondii* 6403, os derivados *N*-acilhidrazônicos apresentaram CFM de 250 µg/mL, exceto o JR-18 que apresentou a CFM de 125 µg/mL para esta cepa.

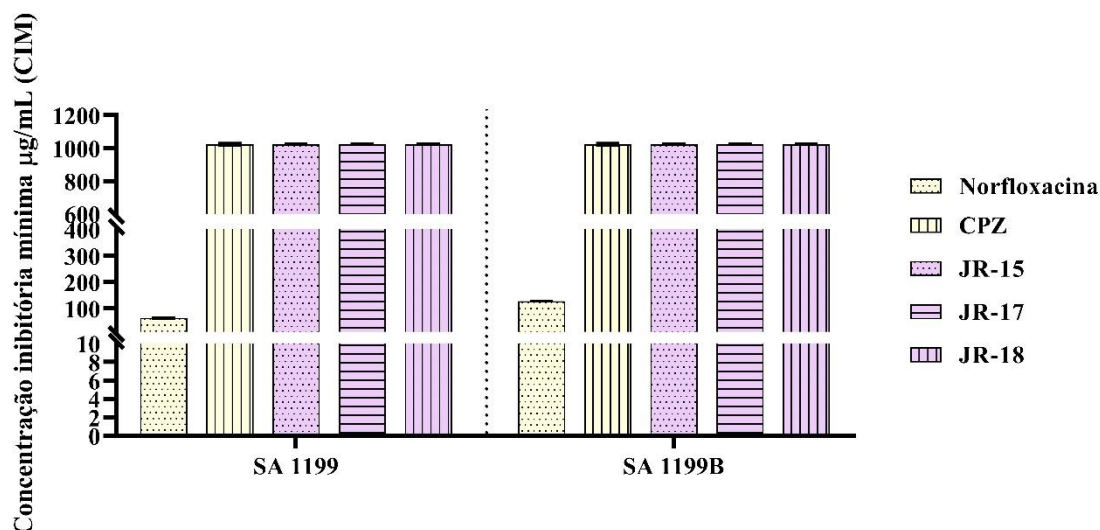
Segundo Castillo-Bejarano *et al.* (2020) a *C. guilliermondii* é uma espécie de *C. não-albicans*, integrante da microbiota fúngica normal da pele e mucosa humana,

apresenta susceptibilidade diminuída aos antifúngicos, tornando seu manejo um desafio terapêutico e a incidência de candidemia por esta levedura varia de 1 % a 3 % dependendo da localização geográfica.

5.1.1.2 Avaliação da inibição da bomba de efluxo por modificação da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio.

A Figura 14 mostra os resultados da atividade antibacteriana direta dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 comparada aos antibióticos norfloxacin e clorpromazina (CPZ) em relação as cepas de *Staphylococcus aureus* SA1199B, que superexpressa a proteína de efluxo NorA e a sua cepa selvagem SA1199. Os derivados testados não apresentaram atividade antibacteriana direta frente as cepas SA1199 e SA1199B.

Figura 14 - Avaliação do perfil antibacteriano dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 frente as cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B em comparação com o controle de antibiótico Norfloxacin.

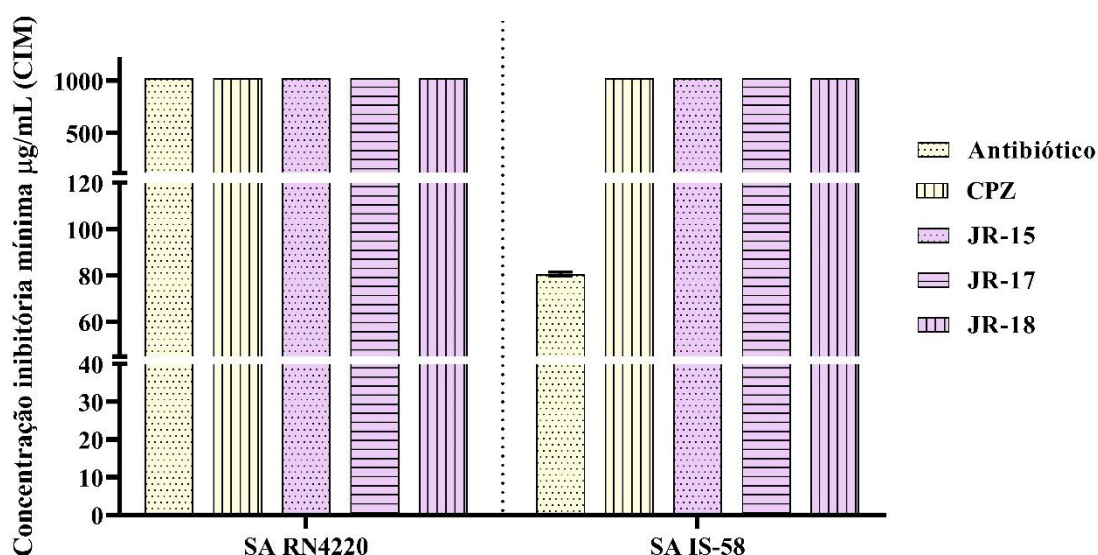


Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como *post hoc*. $a4 = P < 0,0001$ vs Norfloxacin; CPZ = clorpromazina.

Os derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 não apresentaram atividade antibacteriana direta frente as cepas de *Staphylococcus aureus* RN4220 e

IS-58 que possuem as bombas de efluxo MsrA e Tet(K), respectivamente como mostrado na Figura 15. O antibiótico testado para a cepa SA RN4220 foi a eritromicina e para a cepa SA IS-58 foi a tetraciclina e foram comparados ao antibiótico clorpromazina.

Figura 15 - Avaliação do perfil antibacteriano dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 frente as cepas de *S. aureus* RN4220 e IS-58 em comparação com os controles antibióticos Eritromicina e Tetraciclina, respectivamente.



Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como *post hoc*. Antibiótico = Eritromicina utilizado com RN4220 e Tetraciclina utilizado com IS-58; $a_4 = P < 0,0001$ vs antibiótico; CPZ = clorpromazina.

A avaliação da inibição da bomba de efluxo pela redução da CIM do antibiótico foi realizada através da associação dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 em uma concentração subinibitória (CIM/8) para saber se tinha ação inibitória em associação com o antibiótico.

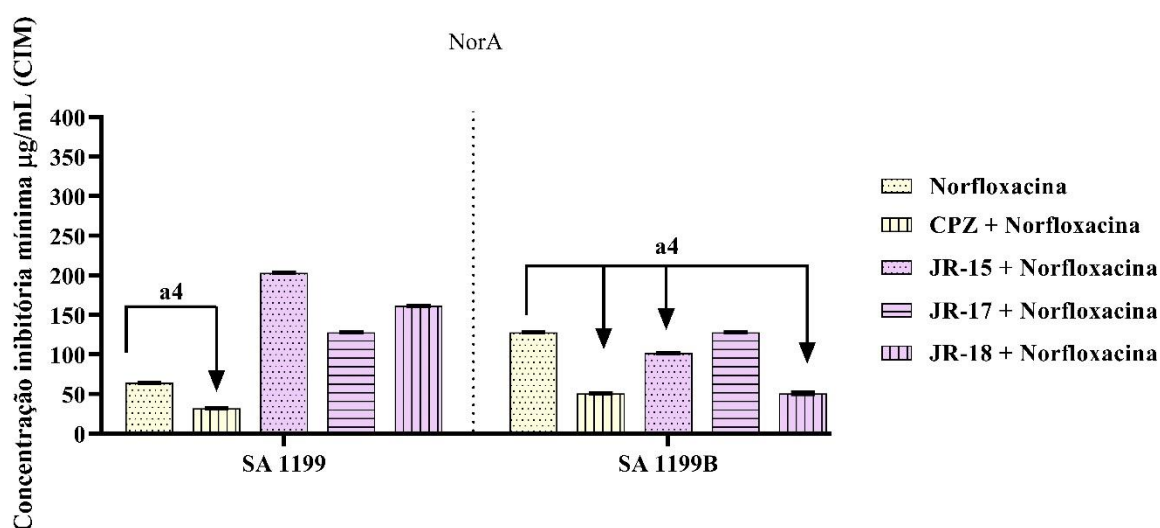
A Figura 16 apresenta a capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados em estudo frente as cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B e mostra que em relação a cepa SA-1199 nenhum dos derivados (JR-15, JR-17 e JR-18) em associação com a norfloxacin apresentaram inibição significativa. Em relação a cepa SA-1199B, os derivados JR-15 e JR-18 em associação a norfloxacin reduziram a CIM da norfloxacin quando comparado a norfloxacin sozinha, esse resultado sugere que o JR-15 e JR-18 inibiu a bomba de efluxo NorA.

Estes resultados corroboram com a pesquisa realizada por Dantas e

colaboradores (2018), no qual avaliou uma série de hidrazonas aminoguanidinas associadas a norfloxacina frente a cepa SA-1199B, e mostraram ser supostos inibidores da bomba de efluxo NorA, podendo ser associados à norfloxacina para o tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a norfloxacina e que superexpressam genes para bombas de efluxo NorA.

A bomba de efluxo NorA atua fazendo a extrusão da norfloxacina para fora da bactéria impedindo sua ação. A associação do JR-15 e JR-18 com a norfloxacina inibiu a bomba de efluxo e favoreu a ação da norfloxacina para impedir o crescimento bacteriano. O derivado JR-17 não apresentou efeito significativo quando associado a norfloxacina frente a cepa SA-1199B.

Figura 16 - Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com Norfloxacina, frente as cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B.

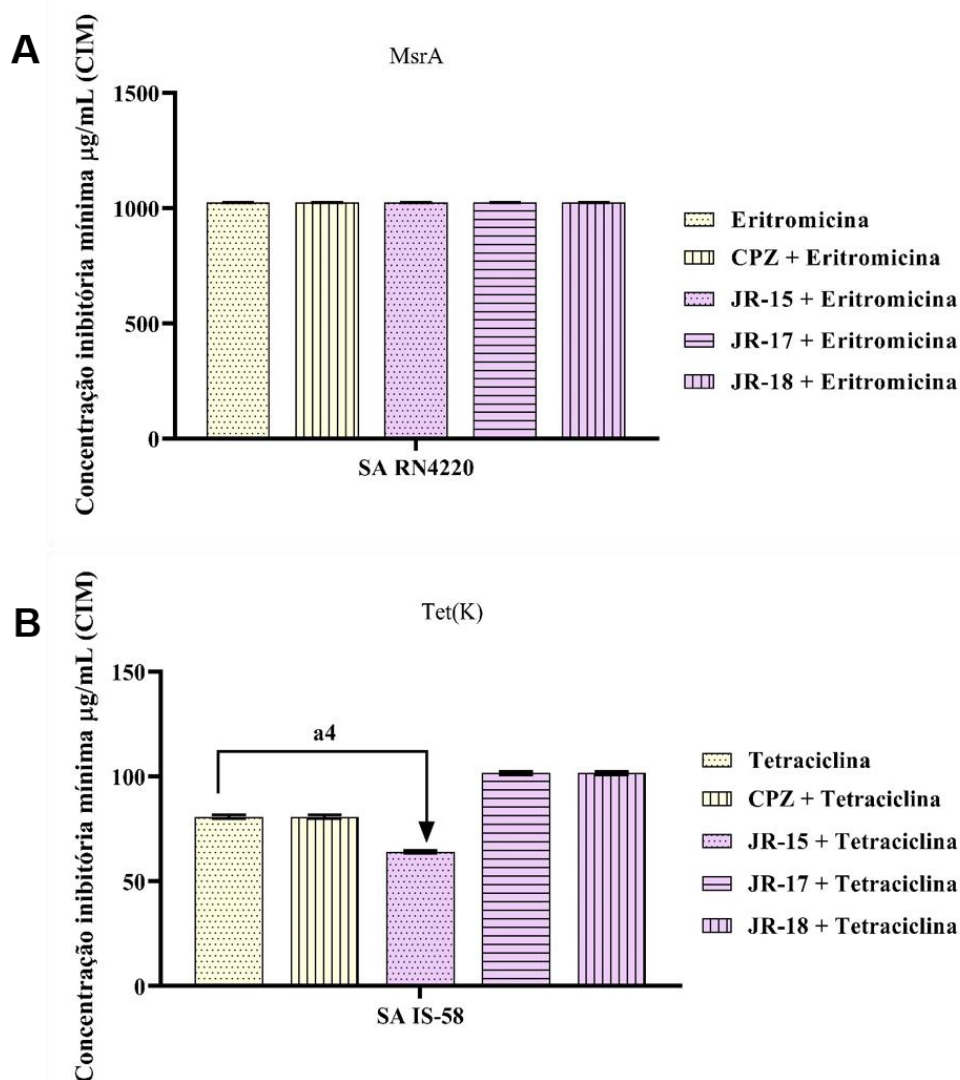


Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como *post hoc*. $a4 = P < 0,0001$ vs Norfloxacina; CPZ = clorpromazina.

A avaliação da capacidade de inibição das bombas de efluxo MsrA e Tet(K) pelos compostos JR-15, JR-17 e JR-18 em associação com eritromicina e tetraciclina, frente as cepas de *S. aureus* RN4220 e IS-58 está disposta na Figura 17 A e B. A Figura 17 A apresenta os derivados em associação com a eritromicina testados frente a cepa SA RN4220 portadora da bomba de efluxo MsrA e de acordo com os resultados, sugere que não houve atividade sinérgica de nenhum dos derivados em

estudo com a eritromicina, provavelmente não houve inibição da bomba de efluxo e com isso não potencializou o efeito da eritromicina.

Figura 17 - Avaliação da capacidade de inibição das bombas de efluxo MsrA e Tet(K) pelos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com Eritromicina e Tetraciclina, frente as cepas de *S. aureus* RN4220 (A) e IS-58 (B).



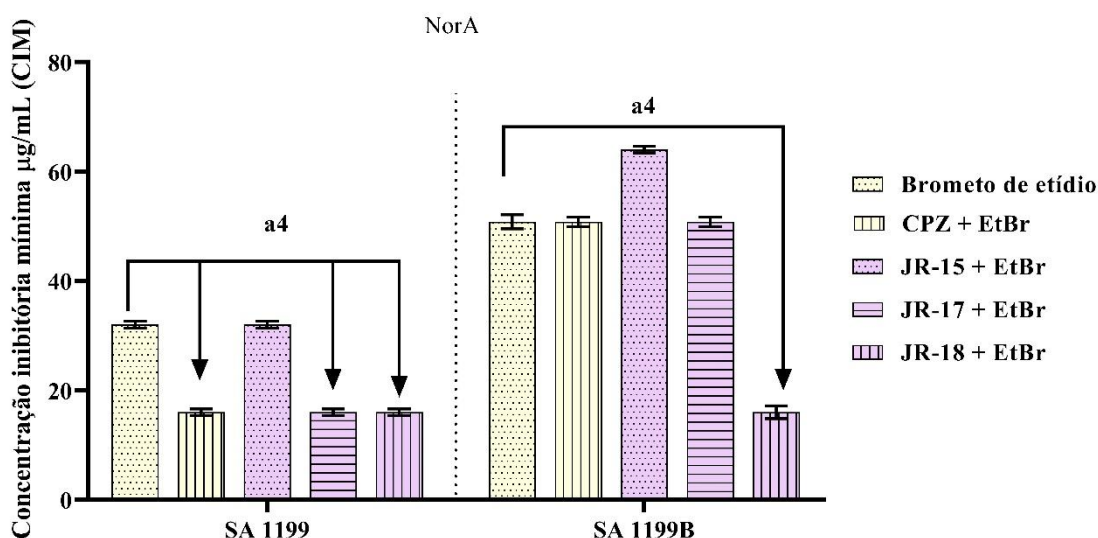
Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como *post hoc*. a4 = $P < 0,0001$ vs antibiótico; CPZ = clorpromazina.

A Figura 17 B, mostra os resultados dos derivados JR-15, JR-17 e JR-18 em associação com a tetraciclina frente a cepa SA IS-58 portadora da bomba de efluxo Tet(K). De acordo com os dados obtidos, ocorreu um efeito sinérgico do JR-15 com a tetraciclina, o que sugere que o JR-15 pode ter inibido a bomba Tet(K) e com isso

potencializou o efeito da tetraciclina. Os derivados JR-17 e JR-18 não apresentaram atividade frente a esta cepa quando associados a tetraciclina.

O resultado da avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com brometo de etídio, frente as cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B estão descritos na Figura 18. Frente à cepa SA-1199, a associação do JR-17 e JR-18 ao brometo de etídio foi significativa, demonstrando assim potencial como um possível inibidor de bomba NorA; já em relação ao JR-15, essa associação não promoveu sinergismo e consequentemente não ocorreu inibição da bomba de efluxo. Frente à cepa SA-1199B, apenas a associação do JR-18 com o brometo de etídio apresentou o efeito sinérgico de provável inibição da bomba de efluxo NorA.

Figura 18- Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com brometo de etídio, frente as cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-1199B.



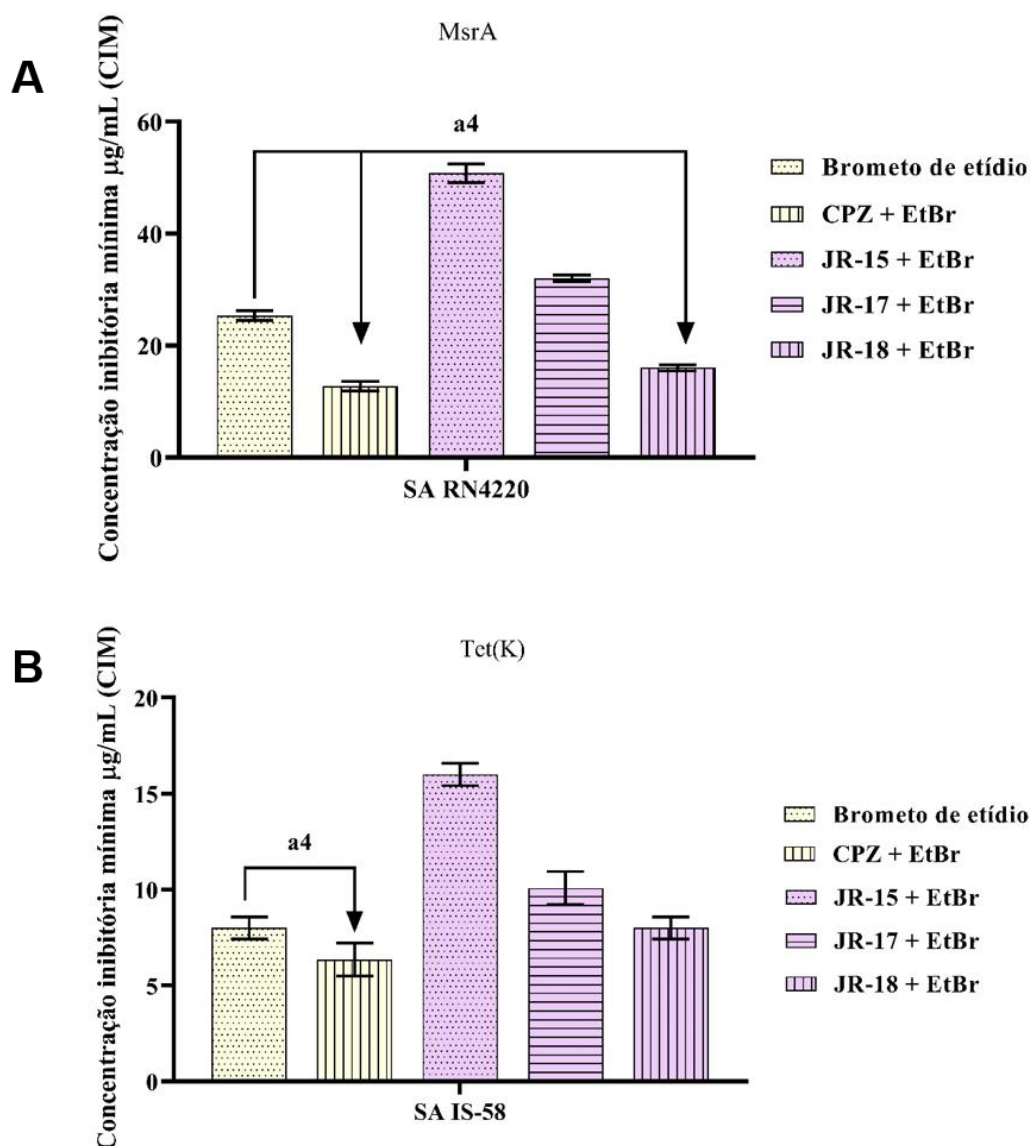
Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como *post hoc*. a4 = $P < 0,0001$ vs Brometo de etídio; EtBr = brometo de etídio; CPZ = clorpromazina.

A avaliação de inibição da bomba de efluxo pela redução da CIM do brometo de etídio foi realizada para verificar a presença de bomba de efluxo. O brometo de etídio é um corante intercalante de DNA e também substrato da bomba de efluxo (WHITTLE *et al.*, 2019). A bomba de efluxo remove brometo de etídio e outras substâncias tóxicas de dentro das bactérias. A inibição da bomba resulta em mais

brometo no interior, permitindo que mais moléculas se liguem ao DNA; isso resulta em aumento da fluorescência (TINTINO *et al.*, 2020).

A figura 19 mostra a avaliação da capacidade de inibição das bombas de efluxo MsrA e Tet(K) pelos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com brometo de etídio, frente as cepas de *S. aureus* RN4220 e IS-58.

Figura 19 - Avaliação da capacidade de inibição das bombas de efluxo MsrA e Tet(K) pelos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-15, JR-17 e JR-18 na associação com brometo de etídio, frente as cepas de *S. aureus* RN4220 (A) e IS-58 (B).



Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey como *post hoc*. a4 = $P < 0,0001$ vs Brometo de etídio; EtBr = brometo de etídio; CPZ = clorpromazina.

Frente a cepa *S. aureus* RN4220 que possui a bomba de efluxo MsrA, apenas

o JR-18 apresentou efeito sinérgico associado ao brometo de etídio, sugerindo inibição da bomba MsrA, as associações dos outros derivados testados JR-15 e JR-17 ao brometo de etídio, não apresentaram efeito sinérgico para inibição da bomba de efluxo (Figura 19 A). A figura 19 B apresenta, a associação dos derivados em estudo ao brometo de etídio frente a cepa SA IS-58 que possui a bomba de efluxo Tet(K) e mostrou que não houve atividade sinérgica para inibição da bomba de efluxo.

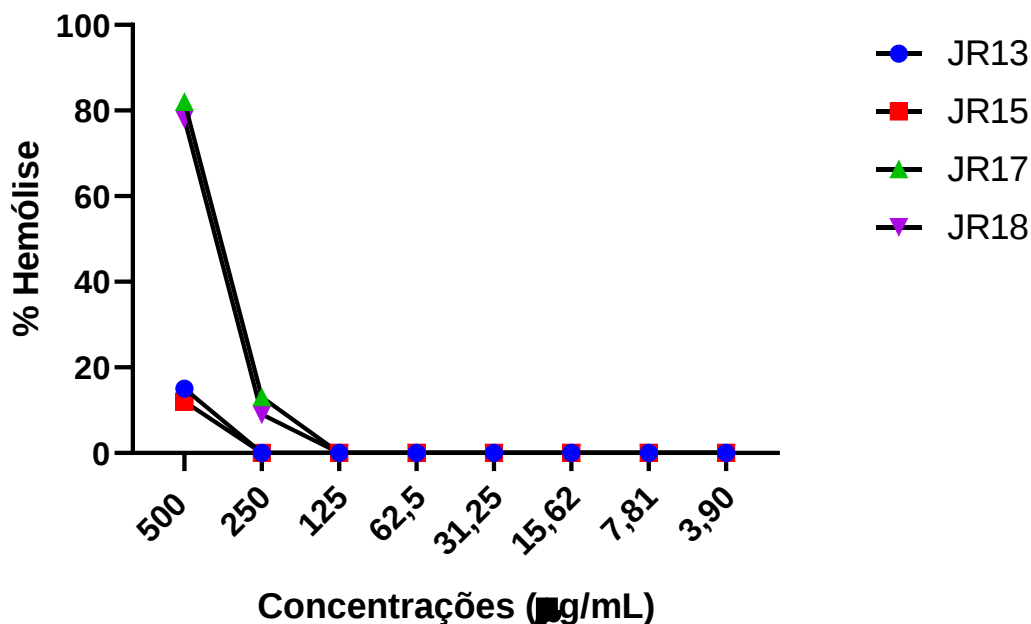
De maneira geral todos os derivados *N*-acilhidrazônicos testados apresentaram atividade antitumoral aos patógenos ESKAPEE, com destaque para o JR-15 e JR-18 que- associados a norfloxacin apresentaram sinergismo frente a cepa SA-1199B que possui a bomba de efluxo NorA. Além disso, o JR-15 associado à tetraciclina promoveu inibição significativa frente a cepa SA IS-58 sugerindo a inibição da bomba de efluxo Tet(K) e o JR-18 associado ao brometo de etídio apresentou inibição significativa frente as cepas SA-1199B e SA RN4220 que possuem as bombas de efluxo NorA e MsrA respectivamente. Sendo assim, sugere-se que o JR-15 seja inibidor da bomba de efluxo NorA e Tet(K) e o JR-18 da NorA e MsrA.

5.1.2 Atividade Hemolítica

No presente estudo, o teste de hemólise em eritrócitos de camundongos *in vitro* foi empregado para a avaliação da atividade hemolítica dos derivados *N*-acilhidrazônicos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18. As concentrações estudadas variaram entre 3,90 - 500 µg/mL, nas quais foi observada hemólise de 15% e 12% na concentração de 500 µg/mL para o JR-13 e JR-15 respectivamente. O derivado *N*-acilhidrazônico JR-17 apresentou hemólise de 82% e 13% para as concentrações 500 µg/mL e 250 µg/mL e o JR-18 hemólise de 78% e 9% para as concentrações 500 µg/mL, e 250 µg/mL respectivamente (Figura 20).

Os resultados demonstram que estes derivados *N*-acilhidrazônicos apresentaram hemólise para concentrações acima de 250 µg/mL, segundo Costa-Lotufo e colaboradores (2005), um produto só é considerado citotóxico quando ocorre hemólise com concentração abaixo de 200 µg/mL, sugerindo que os derivados *N*-acilhidrazônicos não causam danos às membranas dos eritrócitos de camundongos.

Figura 20 - Efeito hemolítico dos derivados *N*-acilhidrazônicos na membrana dos eritrócitos de camundongos.



5.1.3 Citotoxicidade

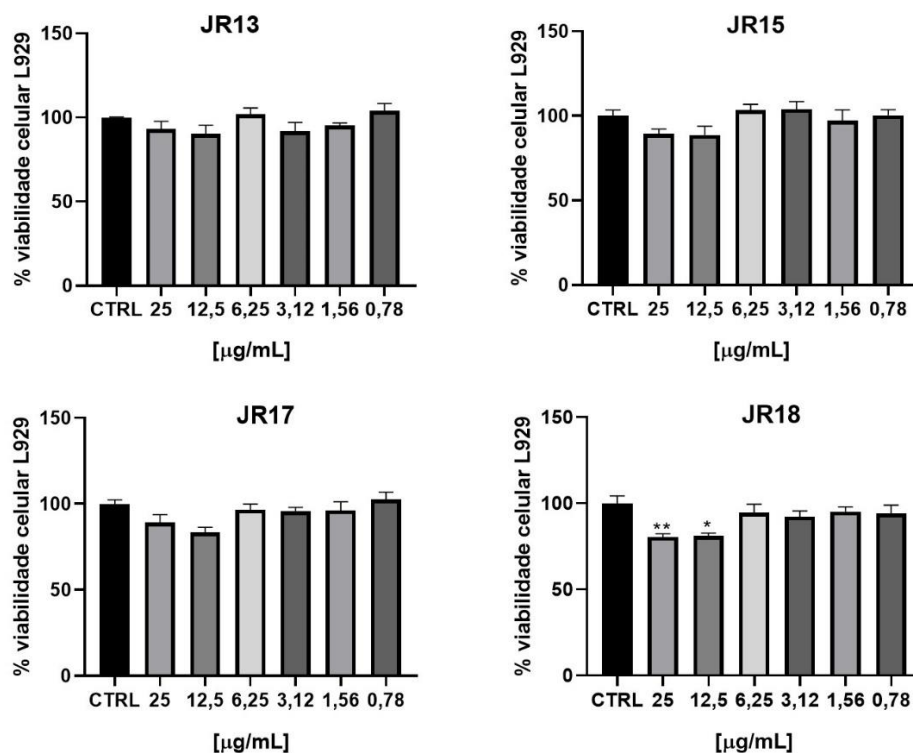
Para a avaliação da citotoxicidade dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18, foi realizado o ensaio com MTT nas linhagens celulares L929 (fibroblastos murino), J774 (macrófagos murino) e macrófagos peritoneais (Camundongos *Swiss*). Foi determinado o percentual de viabilidade celular e os resultados mostraram que os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 não apresentaram efeitos citotóxicos nas células testadas, já que todos apresentaram a viabilidade celular > 70%, nas concentrações testadas. Este é o padrão para ausência de citotoxicidade declarado na ISO 10993-5 (International Organization for Standardization), de acordo com a mesma, para que os materiais testados sejam considerados não tóxicos, devem obter resultados que indicam viabilidade acima do especificado, que é viabilidade > 70% calculada em relação ao controle (JO *et al.*, 2017).

A figura 21 apresenta o percentual de viabilidade celular dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos em estudo diante dos fibroblastos murino (L929) após 72 horas de tratamento pelo método colorimétrico MTT. As concentrações testadas

foram 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,12 µg/mL; 1,56 µg/mL e 0,78 µg/mL e os resultados obtidos de viabilidade celular, quando comparados ao controle 100%, para o JR-13 variaram de 90% a 100%. Para o JR-15 a porcentagem de viabilidade celular variou de 89% a 100% e para o JR-17 de 84% a 100% de acordo com as concentrações descritas. Para o derivado JR-18 as porcentagens foram de 81% a 95%, ressaltamos que nas concentrações 25 µg/mL (81%) e 12,5 µg/mL (82%) apresentaram significância estatística em relação ao controle, como sinalizada no gráfico, porém não suficiente para inferir citotoxicidade já que a viabilidade celular está acima de 70%.

A investigação da atividade citotóxica de uma série de novas *N*-acilhidrazonas, 4-metoxi-1,3-benzenodiolil-hidrazonas, contra a linhagem celular L929 revelou que nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade significativa, de acordo com a pesquisa realizada por Chaoqing Wang e colaboradores (2019) corroborando com este estudo.

Figura 21 - Percentual de viabilidade celular dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 em fibroblastos murino (L929) após 72 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.



Os valores representam a média (n= 6), significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle, * p < 0,05 e **p < 0,01.

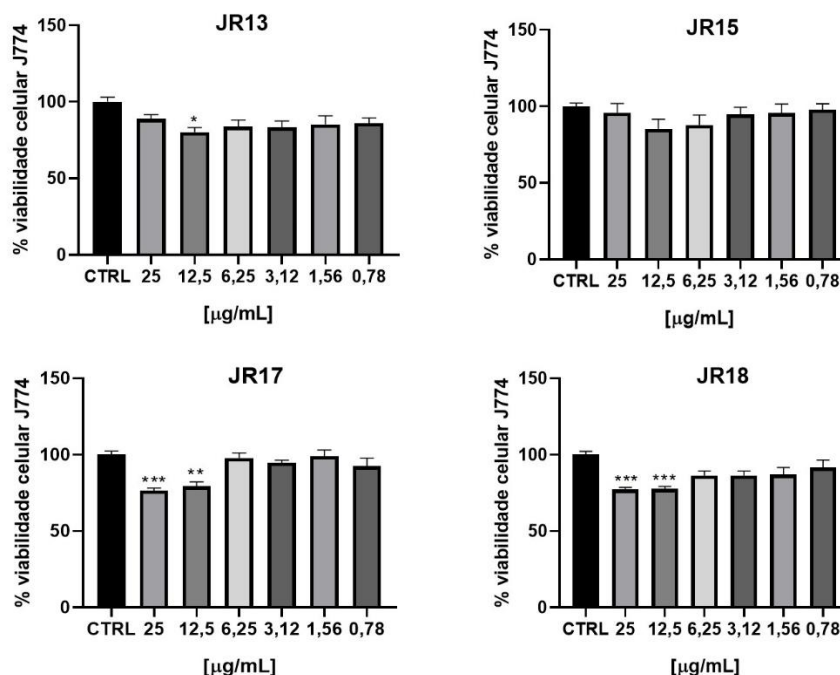
Os resultados para o MTT com macrófagos murino (J774) estão dispostos na

figura 22. Em ordem decrescente de concentração de 25 µg/mL a 0,78 µg/mL as porcentagens de viabilidade celular para o JR-13 quando comparadas ao controle 100%, variaram de 80% a 89%, a concentração 12,5 µg/mL (80%) apresentou significância estatística, porém não sugestivo de citotoxicidade. Para o JR-15 a viabilidade celular variou de 85% a 98% entre as concentrações testadas e não houve significância estatística em nenhuma das concentrações quando comparadas ao controle. As porcentagens de viabilidade celular do JR-17 variaram de 76% a 99%, houve significância estatística, quando comparado ao controle, nas concentrações 25 µg/mL (76%) e 12,5 µg/mL (79%), como apresentado no gráfico, porém não suficiente para inferir citotoxicidade. Resultado semelhante aconteceu com o derivado JR-18 nas concentrações 25 µg/mL (77%) e 12,5 µg/mL (78%) como destacado no gráfico correspondente.

Os resultados corroboram com a pesquisa de Rozada e colaboradores (2019) na qual foram realizados ensaios de citotoxicidade em células J774 para verificar a toxicidade das *N*-acilhidrazonas em estudo e para todas as células testadas as *N*-acilhidrazonas, apresentam viabilidade celular superior a 80%.

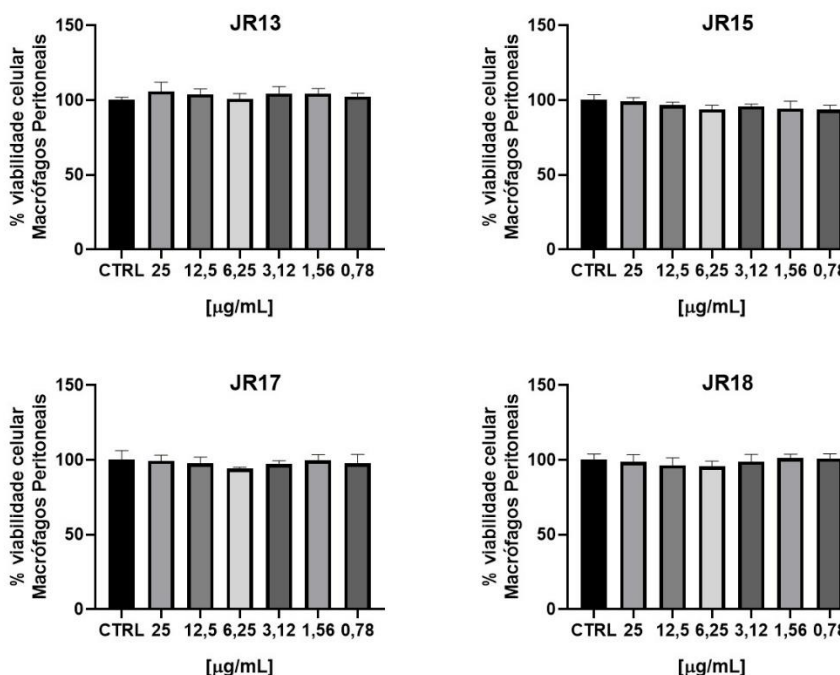
A viabilidade celular dos macrófagos peritoneais induzidos por tioglicolato e tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos em estudo está disposta na figura 23. Os resultados mostram uma média de 100% de viabilidade celular em todos os derivados testados, nas concentrações testadas. Portanto, os novos derivados *N*-acilhidrazônicos testados não alteraram a atividade da redutase mitocondrial em células isoladas de um estado inflamatório agudo, especificamente, macrófagos peritoneais induzidos por tioglicolato. Os resultados corroboram com a pesquisa de Coimbra e colaboradores (2019) onde, a maioria dos derivados de 2-pirimidinil-hidrazona mostrou citotoxicidade insignificante em macrófagos peritoneais induzidos por tioglicolato.

13, JR-15, JR-17 e JR-18 em macrófagos murino (J774) após 72 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.



Os valores representam a média (n= 6), significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle, * p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

Figura 23 - Percentual de viabilidade celular dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 em macrófagos peritoneais induzidos por Tioglicolato em camundongos *Swiss* após 24 horas de tratamento pelo método colorimétrico do MTT.

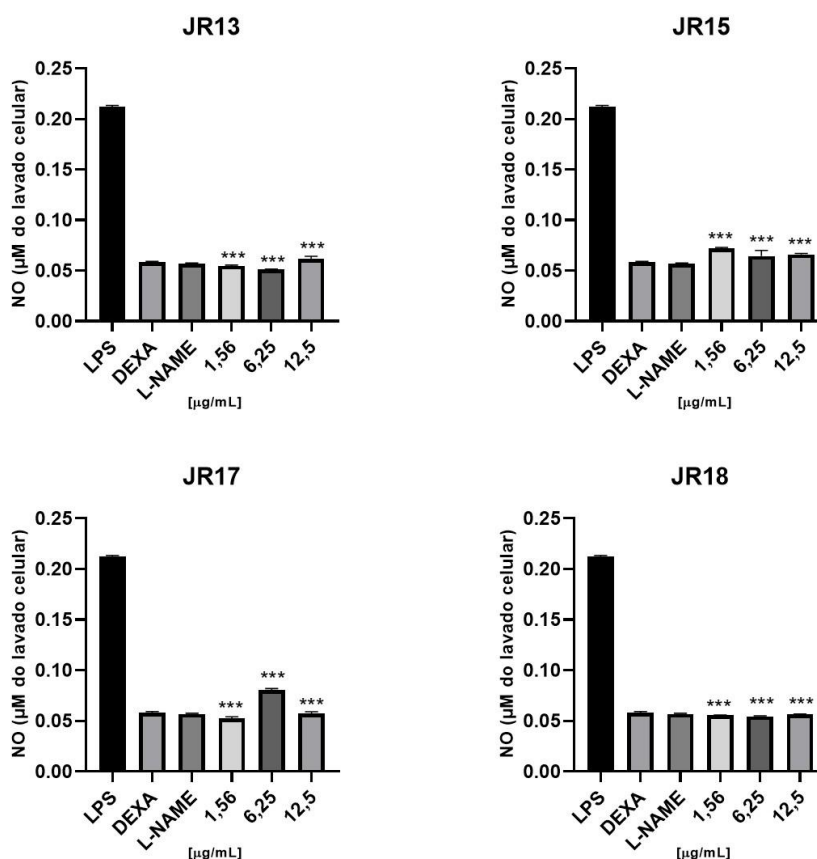


Os valores representam a média (n= 6), significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle, **p < 0,01.

5.1.4 Atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos

A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi realizada em macrófagos peritoneais murinos estimulados por LPS, inicialmente através da dosagem da concentração de nitrito/nitrato (indicativa da produção de óxido nítrico) no sobrenadante celular. A Figura 24 mostra a quantificação indireta de NO no sobrenadante celular, na qual mostra que todos os derivados *N*-acilhidrazônicos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) testados apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de NO nas concentrações testadas quando comparadas ao grupo LPS. Os níveis de NO foram semelhantes nas três concentrações testadas (1,56 µg/mL, 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL) e não tiveram significância quando foram comparados entre si, sendo assim, a concentração de 6,25 µg/mL foi a escolhida para a realização da dosagem das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias.

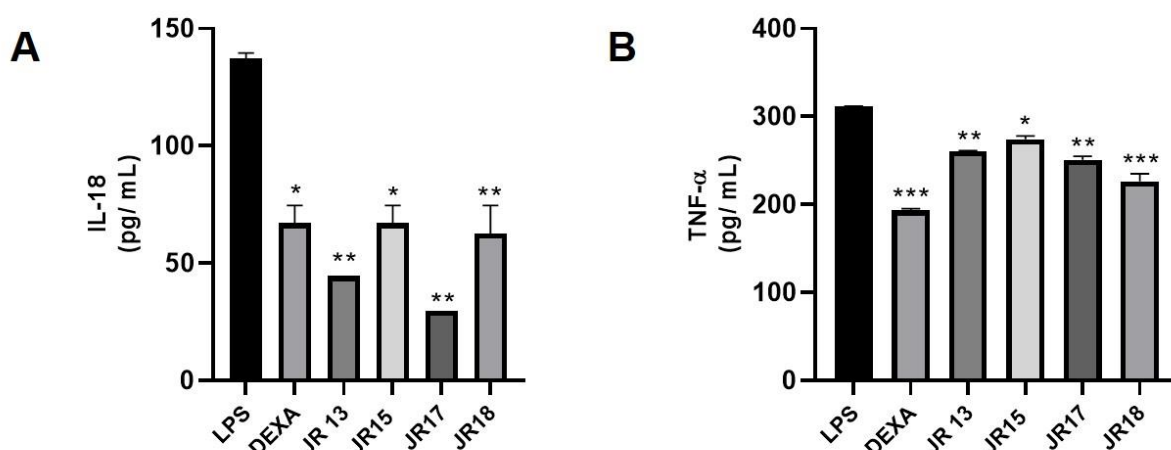
Figura 24 - Quantificação indireta de NO pelos níveis de nitrato/nitrito no lavado celular de macrófagos murino estimulados com LPS e tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18), dexametasona e L-NAME.



NO no sobrenadante celular *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo LPS. Significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey.

A Figura 25 (A – B) mostra os resultados dos níveis das citocinas inflamatórias IL-18 e TNF- α no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais murino estimulados com LPS e após tratamento de 24 h com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na concentração de 6,25 μ g/mL e dexametasona. Os derivados inibiram significativamente a produção das citocinas quando comparadas ao LPS e apresentaram comportamento semelhante ao grupo tratado com dexametasona, o que indica o perfil anti-inflamatório promovido pelos derivados *N*-acilhidrazônicos em estudo.

Figura 25 - Níveis de citocinas IL-18 e TNF- α no lavado celular de macrófagos murino estimulados com LPS e após tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 e dexametasona.



Citocinas IL-18 e TNF- α no lavado celular ***p < 0,001 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo LPS. Significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey.

Os macrófagos são um dos componentes mais importantes do sistema imunológico, participam das respostas imunes inatas e adaptativas e participam do controle de infecções e processos inflamatórios. Podem ser divididos em macrófagos M1 e M2; os macrófagos M1 são geralmente ativados por interferon- γ e LPS, secretam principalmente fatores inflamatórios e estão presentes na inflamação precoce. Os macrófagos M2 são ativados por citocinas Th2, como IL-4, IL-13 e imunógenos e expressam fatores de inibição inflamatória com efeito na inibição da resposta inflamatória e reparo tecidual (FEITO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2022).

Os resultados corroboram com a pesquisa de Moraes e colaboradores (2018) que avaliou o potencial anti-inflamatório de derivados *N*-acilhidrazônicos *in vitro* e

obtiveram resultados satisfatórios em relação a essa atividade com alta produção das citocinas IL-4 e IL-10, além da baixa produção de IFN- γ , os quais são indicadores do estado anti-inflamatório e baixa liberação de óxido nítrico que é um mediador chave da resposta inflamatória.

5.2 ENSAIOS *IN VIVO*

5.2.1 Ensaio Toxicológico Não Clínico

Os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg administrado por via oral em camundongos fêmeas, não produziram morte e não causaram efeitos na locomoção, respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, diarreia, micção, piloereção, ptose e alteração screening comportamental no período de 14 dias de observação.

Alterações significativas na massa corpórea e no consumo de água e ração, podem expressar toxicidade ou serem tomadas como medida de efeitos adversos (YI-CHEN *et al.*, 2018). Após o período de 14 dias de observação e análise do consumo de água e ração e o ganho de massa corpórea, foi observado que houve um aumento gradativo da massa corpórea. Esse aumento também foi observado no consumo de água e ração entendendo-se que foram aumentos compatíveis com o ganho de massa corpórea, já que não houve diferença significativa dos grupos tratados com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos quando comparados com o grupo controle nos três parâmetros observados (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do tratamento agudo dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg, sobre o consumo de ração, o consumo de água e o ganho de massa corporal de camundongos fêmeas por 14 dias de observação

PARÂMETROS	CONTROLE	JR-13	JR-15	JR-17	JR-18
Consumo de ração (g)	19,71 ± 1,98	18,21 ± 1,19	18,07 ± 1,85	19,93 ± 1,49	19,79 ± 1,12
Consumo de água (mL)	29,71 ± 2,87	26,86 ± 2,93	32,21 ± 2,99	32,36 ± 2,21	31,64 ± 2,65
Ganho de massa corporal (g)	4,17 ± 0,75	4,33 ± 0,52	4,00 ± 0,63	4,67 ± 0,82	4,67 ± 0,82

Os valores representam a média (n= 6), significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle, $p < 0,05$.

O peso médio dos órgãos pulmão, coração, rins, baço fígado e estômago de cada grupo não foram afetados com a administração aguda como podemos observar na tabela 4, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 4 - Efeito do tratamento agudo dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg, sobre o peso médio (g) dos órgãos de camundongos fêmeas por 14 dias de observação

ÓRGÃOS	CONTROLE	JR-13	JR-15	JR-17	JR-18
Pulmão	0,427 ± 0,043	0,302 ± 0,074	0,475 ± 0,143	0,415 ± 0,086	0,301 ± 0,026
Coração	0,280 ± 0,073	0,307 ± 0,033	0,419 ± 0,104	0,351 ± 0,102	0,253 ± 0,042
Rins	0,536 ± 0,132	0,571 ± 0,017	0,67 ± 0,113	0,602 ± 0,150	0,551 ± 0,093
Baço	0,224 ± 0,006	0,405 ± 0,057	0,372 ± 0,100	0,362 ± 0,127	0,352 ± 0,026
Fígado	2,467 ± 0,368	2,32 ± 0,181	2,296 ± 0,294	2,343 ± 0,244	2,306 ± 0,165
Estômago	0,405 ± 0,069	0,505 ± 0,075	0,473 ± 0,046	0,543 ± 0,162	0,411 ± 0,082

Os valores representam a média ± d.p. (n= 6), significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle, $p < 0,05$.

O perfil hematológico (Tabela 5) foi determinado a partir do sangue colhido dos camundongos após 14 dias. Para tal, foram analisados os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos totais e porcentagem de

neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos.

Parâmetros hematológicos alterados podem ser sinal de possível toxicidade, diminuições significativas dos leucócitos sugerem que a administração oral diária da substância pode resultar em enfraquecimento do sistema imunológico. Diminuições na quantidade de hemácias e hemoglobina podem indicar efeito sobre a função hematopoiética (WU *et al.*, 2014). O JR-18 apresentou alteração na quantidade de hemácias com significância de $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. Os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 não apresentaram variação na porcentagem de neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos quando comparados ao grupo controle.

Tabela 5 - Efeito do tratamento agudo dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 na dose de 300 mg/kg, sobre os parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas por 14 dias de observação.

PARÂMETROS	CONTROLE	JR-13	JR-15	JR-17	JR-18
Hemácias (10^6 /mm ³)	8,53 ± 0,63	8,82 ± 0,26	8,83 ± 0,37	6,63 ± 2,18	6,48 ± 0,98*
Hemoglobina (g/dL)	12,82 ± 1,12	13,82 ± 1,41	13,82 ± 0,91	12,45 ± 2,20	11,82 ± 1,69
Hematócrito (%)	37,92 ± 4,92	40,73 ± 3,80	41,17 ± 2,38	36,40 ± 6,70	35,03 ± 4,67
Plaquetas (10^3 /μL)	873 ± 184	923 ± 149	959 ± 151	779 ± 76	703 ± 57
Leucócitos (10^6 / mm ³)	4950 ± 274	5400 ± 200	5267 ± 186	5300 ± 369	5067 ± 333
Neutrófilo (%)	16 ± 4	16 ± 3	17 ± 2	16 ± 4	13 ± 1
Linfócito (%)	77 ± 6	79 ± 4	81 ± 3	79 ± 3	82 ± 2
Monócito (%)	2 ± 0	4 ± 1	3 ± 2	4 ± 1	4 ± 1
Eosinófilos (%)	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1

Os valores representam a média ± d.p. (n= 6), não significativo após ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle $*p < 0,05$.

Segundo Yi-Chen e colaboradores (2018), outras alterações como na quantidade de basófilos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos, parecem ser toxicologicamente irrelevantes porque estão dentro dos limites da variação biológica normal. Após a análise, os resultados mostraram que não houve alteração relevante, em relação à possibilidade de inferir toxicidade nos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos, quando comparados ao grupo controle.

A tabela 6 apresenta os valores séricos dos parâmetros bioquímicos, dosados após o tratamento dos animais com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18, na dose de 300mg/kg e comparados com animais tratados com salina. A dosagem destes parâmetros se propôs principalmente verificar a toxicidade hepática e renal e ao analisar os dados pode-se observar que estes parâmetros não apresentaram alteração com significância estatística que apontasse toxicidade nos diversos órgãos e sistemas avaliados, quando comparados ao grupo controle, sendo assim não apresentaram sinais para inferir toxicidade.

Tabela 6 - Efeito dos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 (300 mg/kg) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas.

PARÂMETROS	CONTROLE	JR-13	JR-15	JR-17	JR-18
Ácido úrico (mg/dL)	3,63 ± 0,33	2,97 ± 0,48	3,76 ± 0,73	3,24 ± 1,44	5,72 ± 1,49
Creatinina (mg/dL)	0,56 ± 0,24	0,32 ± 0,15	0,28 ± 0,08	0,53 ± 0,25	0,48 ± 0,25
AST/TGO (mg/dL)	258 ± 26	182 ± 45	260 ± 37	189 ± 52	328 ± 58
ALT/TGP (mg/dL)	68 ± 8	96 ± 29	107 ± 33	62 ± 21	101 ± 23
Uréia (mg/dL)	45 ± 3	45 ± 4	45 ± 3	49 ± 6	50 ± 7

Os valores representam a média ± d.p. (n= 6), não significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos são critérios importantes de diagnóstico na prática clínica, e alterações nos sistemas hematológicos e bioquímicos

têm um valor preditivo mais alto para a toxicidade humana quando os dados são traduzidos de estudos em animais (CARRILLO; ADENUGA; MCKEE, 2014). Alterações na concentração de colesterol total e triglicerídeo, podem oferecer informações úteis sobre o metabolismo lipídico e a predisposição do coração à aterosclerose e suas doenças cardiovasculares associadas (YI-CHEN *et al.*, 2018). Os derivados *N*-acilhidrazônicos em estudo não apresentaram alterações na concentração dos lipídeos quando comparados ao grupo controle.

As transaminases AST e ALT são enzimas presentes nas células do fígado, hepatócitos, e que são liberadas no sangue em consequência de lesão hepática de naturezas diversas, usadas para indicar uma possível toxicidade. Geralmente, o dano às células do fígado parenquimatoso resulta em elevação de ambas as transaminases (MANGUS *et al.*, 2015). Neste estudo, não houve alteração significativa nos níveis de ALT e AST e não houve anormalidade observada no peso do fígado, sugerindo que os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos não podem ser considerados hepatotóxicos em camundongos (ALGANDABY, 2015).

A creatinina e a uréia são biomarcadores da função renal, elevações no índice desses biomarcadores podem frequentemente estar relacionadas a danos dos néfrons funcionais (YI-CHEN *et al.*, 2018). Na pesquisa, a uréia e a creatinina não apresentaram alteração nos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos quando comparados ao grupo controle, também não foi observada em relação ao peso dos rins quando os grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos foram comparados ao grupo controle como foi mostrado na Tabela 6.

5.2.2 Lesão pulmonar aguda por LPS

5.2.2.1 Contagem de células do lavado broncoalveolar

Os efeitos anti-inflamatórios dos derivados *N*-acilhidrazônicos foram testados em um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. O LPS foi instilado via intratranasal, com ou sem administração por via oral dos derivados *N*-

acilhidrazônicos. Camundongos controle foram tratados com solução salina ou dexametasona. No final do experimento, a lesão pulmonar aguda era uma inflamação caracterizada por um aumento relevante na contagem total de células e neutrófilos no LBA. Uma única administração dos derivados *N*-acilhidrazônicos, no início do experimento atenuou significativamente os neutrófilos induzidos por LPS.

Após a indução do LPS, foi verificada a migração celular para o LBA e as células foram contadas. A análise da contagem de células revelou intensa migração celular no grupo LPS (Tabela 7). Em contraste, os derivados *N*-acilhidrazônicos e dexametasona reduziram a migração celular. É importante ressaltar, a porcentagem de inibição da inflamação da dexametasona (81,2%) e dos novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13 (62,8%), JR-15 (40,9%), JR-17 (83,2%) e JR-18 (86,9 %).

Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas e colaboradores (2018) em uma avaliação do perfil anti-inflamatório de novos derivados de naftil de *N*-acilhidrazonas em modelo animal, o qual foi capaz de promover uma diminuição da migração celular de 51%, comprovando a atividade anti-inflamatória dos derivados em estudo.

Tabela 7 - Total de leucócitos polimorfonucleares e percentual de inibição da migração celular no lavado broncoalveolar dos animais com LPA induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona

Grupo	Nº de Leucócitos/mL (X 10⁶)	Inibição (%)
Salina	1,65 ± 0,09	-
LPS	7,83 ± 0,21	-
Dexametasona	1,47 ± 0,14***	81,2
JR-13 (10 mg/kg)	2,91 ± 0,33***	62,8
JR-15 (10 mg/kg)	4,63 ± 0,30***	40,9
JR-17 (10 mg/kg)	1,32 ± 0,13***	83,2
JR-18 (10mg/kg)	1,03 ± 0,31***	86,9

Os valores representam a média ± d.p. (n= 6) ***p < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo LPS.

A migração celular para o espaço broncoalveolar é uma característica da lesão pulmonar aguda. A contagem diferencial, a cada 100 células, revelou uma

predominância de neutrófilos segmentados no grupo LPS quando comparado ao grupo salina. Em contrapartida, os grupos tratados com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos e dexametasona apresentaram uma redução significativa dessas células $***p < 0,001$, exceto os grupos tratados com JR-15 que apresentaram uma redução com significância de $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo LPS. A contagem de monócitos e linfócitos mostrou diferença significativa de $***p < 0,001$, para os grupos dos derivados *N*-acilhidrazônicos e dexametasona e na contagem de eosinófilos houve diferença significativa apenas nos grupos da dexametasona e do JR-17, quando comparados ao grupo LPS (Tabela 8).

Tabela 8 - Total de leucócitos polimorfonucleares e contagem diferencial no lavado broncoalveolar dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona

GRUPOS	Leucócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Neutrófilo (%)	Linfócito (%)	Monócito (%)	Eosinófilos (%)
SALINA	1650 $\pm$ 91	43 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
LPS	7831 $\pm$ 214	63 $\pm$ 3	19 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
DEXAMETASONA	1469 $\pm$ 144	46 $\pm$ 2 ^{***}	47 $\pm$ 2 ^{***}	3 $\pm$ 1 ^{***}	4 $\pm$ 1 ^{***}
JR-13	2912 $\pm$ 327	57 $\pm$ 2 ^{***}	41 $\pm$ 2 ^{***}	9 $\pm$ 1 ^{***}	2 $\pm$ 1
JR-15	4625 $\pm$ 298	58 $\pm$ 5 [*]	32 $\pm$ 6 ^{***}	7 $\pm$ 1 ^{***}	2 $\pm$ 1
JR-17	1318 $\pm$ 125	43 $\pm$ 2 ^{***}	51 $\pm$ 2 ^{***}	2 $\pm$ 1 ^{***}	4 $\pm$ 1 ^{***}
JR-18	1028 $\pm$ 305	55 $\pm$ 3 ^{***}	38 $\pm$ 3 ^{***}	5 $\pm$ 1 ^{***}	2 $\pm$ 1

Contagem diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar $*p < 0,05$; $***p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo LPS.

Os neutrófilos são células efetoras inatas, prontas para combater danos e infecções nos tecidos e têm a capacidade para responder rapidamente a sinais de perigo e mobilizar células de reparação. Os neutrófilos são equipados com padrão molecular de superfície associado a danos (DAMPs) e padrão molecular associado a patógenos (PAMPs). Os neutrófilos são transcricionalmente menos ativos que outros leucócitos, mas sua abundância característica nos locais de inflamação garante sua contribuição significativa para a produção de citocinas e quimiocinas (TAN; WENINGER, 2017). O grupo LPS apresentou uma intensa migração leucocitária com predominância de neutrófilos quando comparado aos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos e dexametasona, podendo mostrar uma possível

atividade anti-inflamatória nos compostos em estudo.

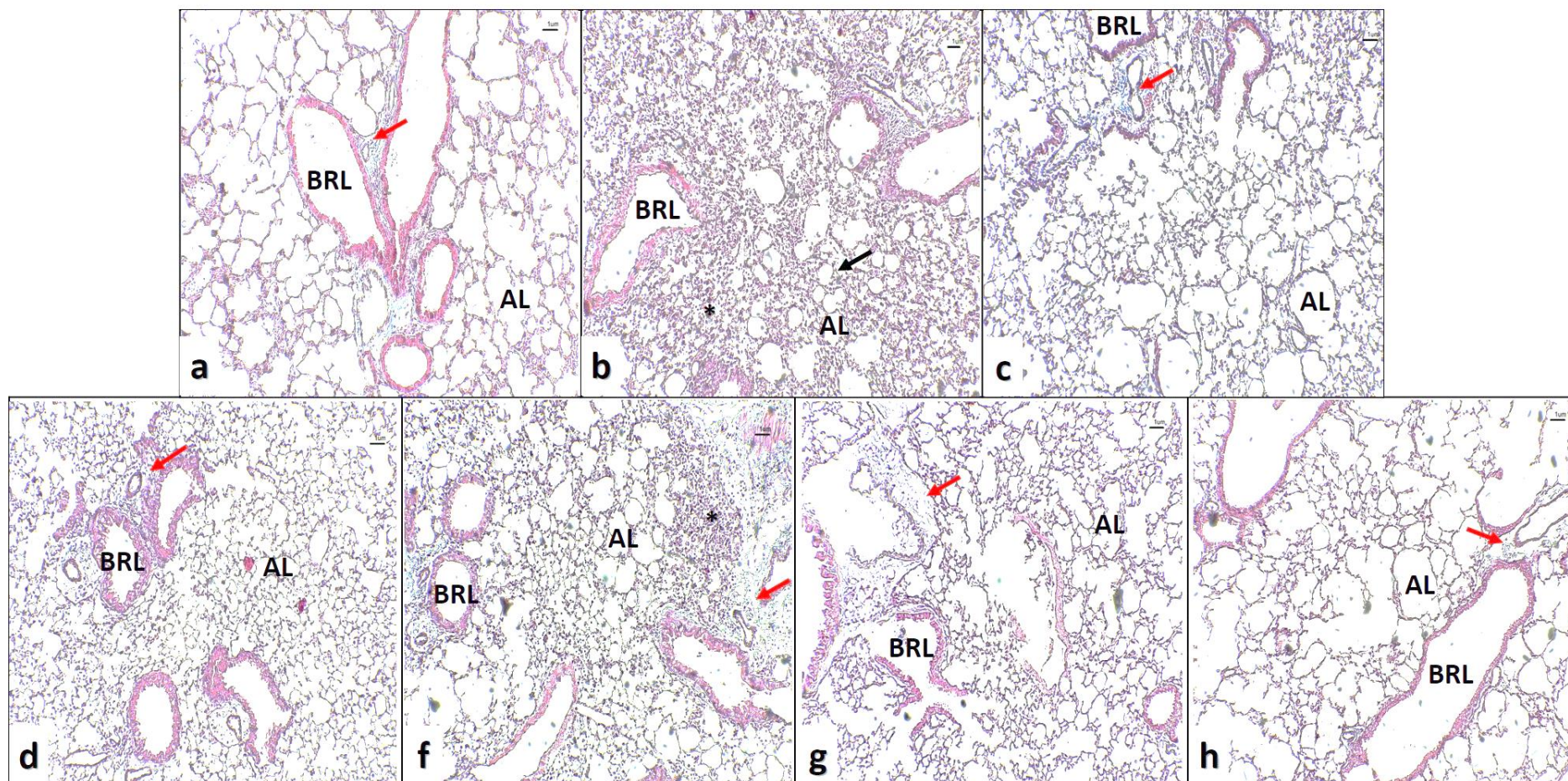
5.2.2.2 Histologia

A análise histopatológica foi realizada nos pulmões de camundongos BALB/c submetidos à indução de lesão aguda por LPS e está representado na figura 26, com a coloração Tricrômico de Masson e aumento de 100x.

Em **a**, grupo sham, está representada uma arquitetura pulmonar preservada. Em **b**, grupo LPS, observa-se a presença de infiltrado leucocitário (asterisco) no espaço intersticial, espessamento da parede do alvéolo (seta) e consequente diminuição da luz alveolar, o que caracteriza dano inflamatório tecidual. Em **c**, grupo dexametasona, foi possível observar a diminuição do infiltrado leucocitário intersticial e regressão da espessura da parede alveolar, porém aparece rompimento de alvéolos e deposição de colágeno peribronquial. Em **d** e **f**, respectivamente os grupos tratados com JR-13 e JR-15, é possível notar diminuição da presença de infiltrado leucocitário e discreta diminuição da espessura da parede alveolar. Em **g** e **h**, grupos tratados com JR-17 e JR-18, respectivamente, notar diminuição do dano alveolar com reestruturação tecidual.

Após o desafio com LPS, a morfologia normal dos tecidos pulmonares foi danificada e foram observadas alterações patológicas, como ruptura alveolar, espessamento da parede alveolar e edema intersticial. O exame microscópico das seções do pulmão dos grupos de tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona identificou focos de consolidação tecidual com células inflamatórias identificadas como linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Segundo NIEMIEC *et al.* (2022), as áreas peribrônquicas de fibrose geralmente se estendem ao longo dos bronquíolos terminais e nos espaços alveolares. A deposição de colágeno foi perceptível através da presença de fibras colágenas em todas as áreas de inflamação reconhecidas por Coloração Tricomico de Masson, indicadas pela seta vermelha.

Figura 26 – Fotomicrografia pulmonar de camundongos BALB/c submetidos à indução de lesão aguda por LPS e tratados com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona com a Coloração Tricomico de Masson. Escala 1 μ m. Aumento de 100x.



Legenda: **a** grupo sham, arquitetura pulmonar preservada. **b** grupo LPS presença de infiltrado leucocitário (asterisco) e espessamento da parede do alvéolo (seta). **c** grupo Dexa, diminuição do infiltrado leucocitário intersticial e regressão da espessura da parede alveolar. **d** e **f**, respectivamente os grupos tratados com JR-13 e JR-15, diminuição do infiltrado leucocitário e discreta diminuição da espessura da parede alveolar. **g** e **h** grupos tratados com JR-17 e JR-18, respectivamente, diminuição do dano alveolar com reestruturação tecidual. Presença de fibras colágenas (seta vermelha).

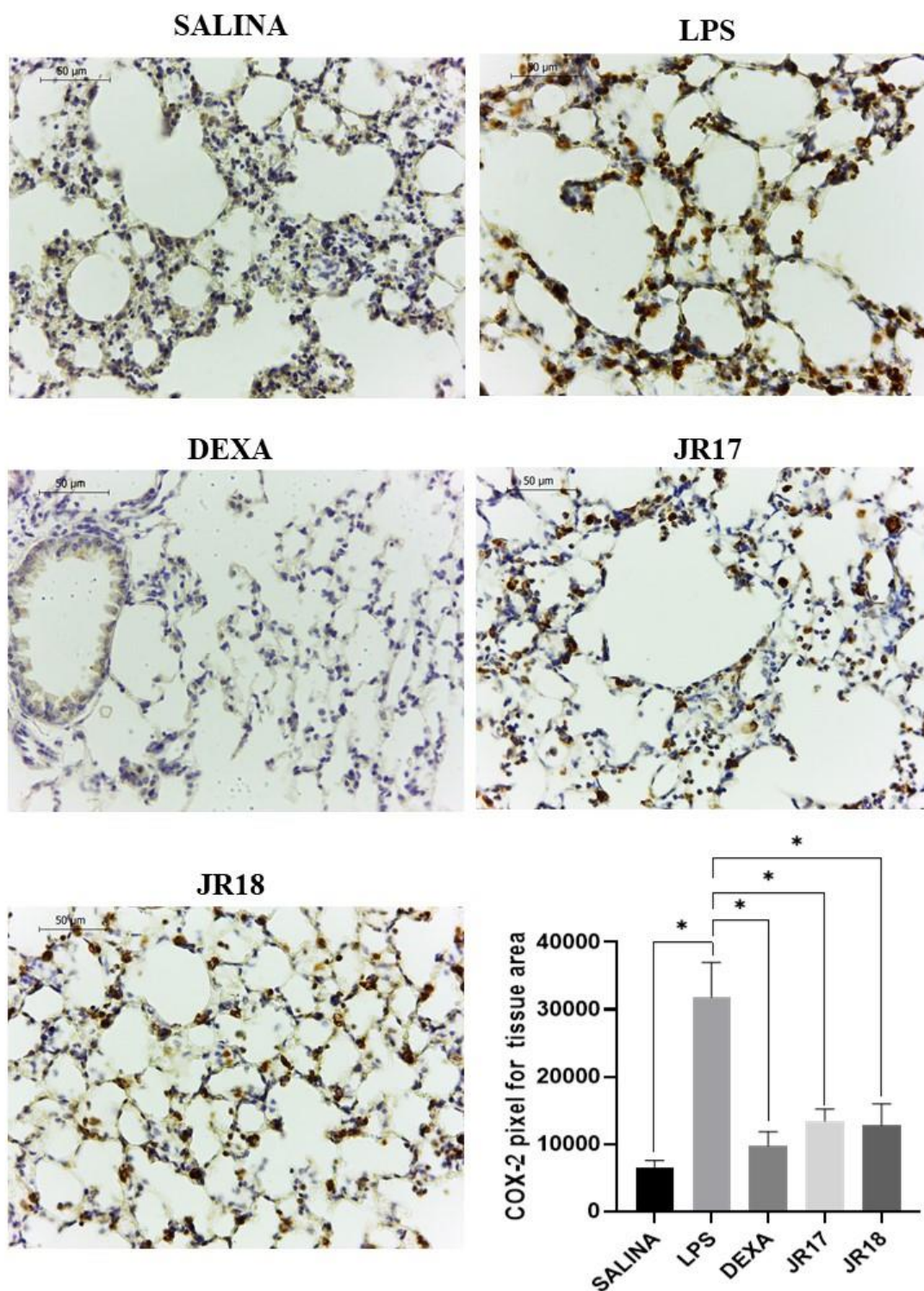
Estes resultados corroboram com os resultados da contagem de células e porcentagem de inibição, onde foi observado uma menor contagem de células e maior inibição da inflamação nos grupos tratados com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona quando comparados ao grupo LPS.

5.2.2.3 Imunohistoquímica

Os resultados da expressão imuno-histoquímica de COX-2 e iNOS, em tecido pulmonar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos JR-17 e JR-18 e dexametasona, estão dispostos nas Figuras 27 e 28, respectivamente. A expressão mais forte de ambos os marcadores foi observada no grupo LPS na forma de grânulos marrom. O grupo salina mostrou uma imunorreação fraca aos marcadores, apresentando diferença significativa em relação ao grupo lesionado ($p < 0,0001$). No grupo tratado com dexametasona (DEXA) também foi observado a diminuição da quantidade desses grânulos para ambos marcadores ($p < 0,0001$). Os derivados JR17 e JR18 apresentaram resultados semelhantes ao grupo salina e DEXA, foi observado a diminuição a reatividade para os marcadores COX-2 e iNOS, o que indica uma diminuição no processo inflamatório em relação com o grupo LPS ($p < 0,0001$). Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Salina versus DEXA ($p = 0,2970$), DEXA versus JR17 ($p = 0,1379$), DEXA versus JR18 ($p = 0,2992$) e JR17 versus JR18 ($p = 0,9897$).

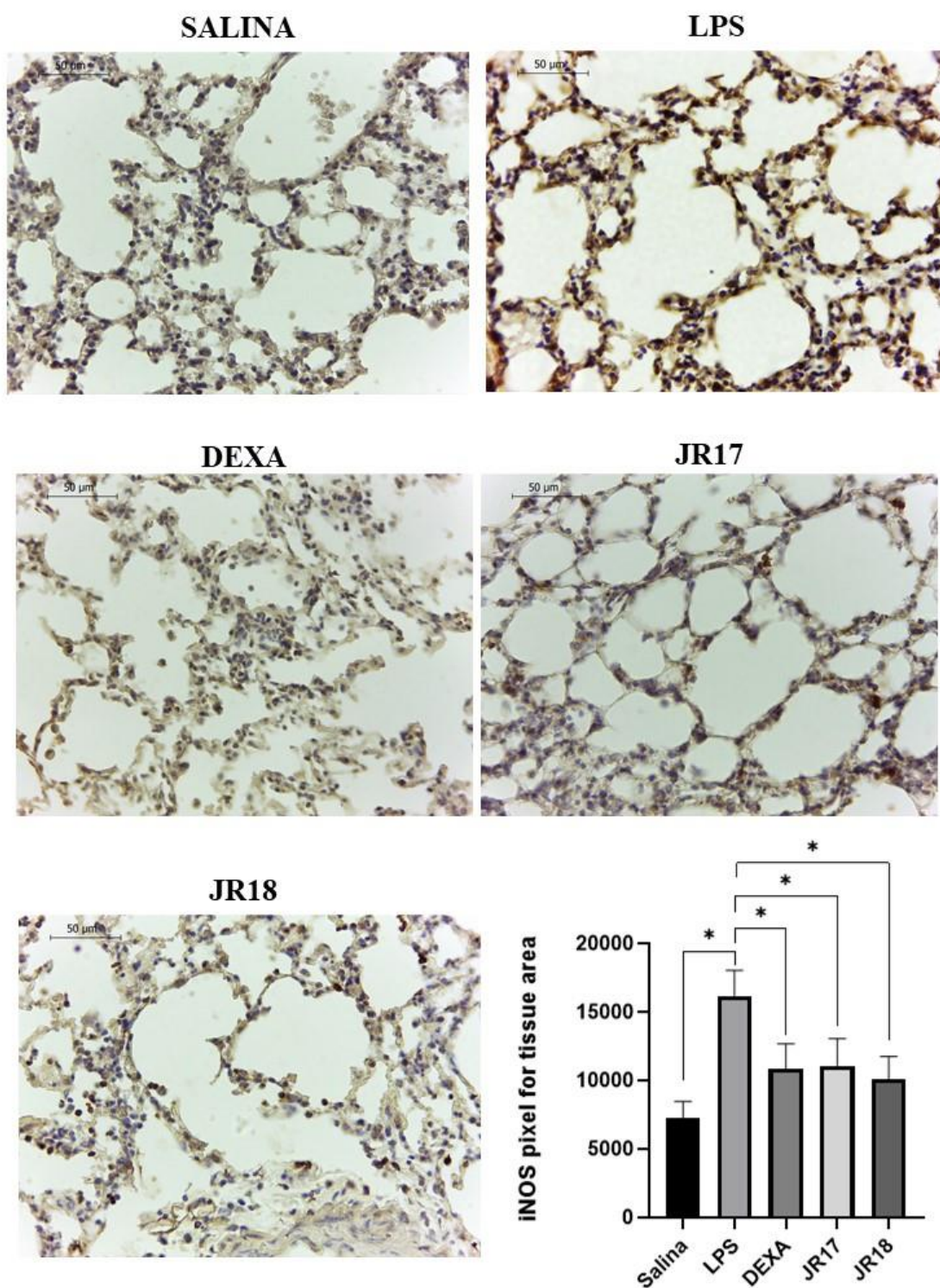
Mediadores pró-inflamatórios como COX-2 e iNOS são fundamentais para a avaliação dos níveis de inflamação (WANG *et al.*, 2019b). A COX-2 é uma enzima induzível envolvida na formação de eicosanóides pró-inflamatórios resultando em dano pulmonar e um marcador clássico de macrófagos e a iNOS desempenham um papel crucial em vários distúrbios respiratórios e indica os níveis de radicais livres *in vivo* (KASSAB *et al.*, 2020). A superexpressão de iNOS e COX-2 diminuiu significativamente com a presença dos derivados JR-17 e JR-18 em resposta à estimulação de LPS.

Figura 27 - Análise imuno-histoquímica da Ciclooxigenase-2 (COX-2) no modelo de lesão pulmonar induzida por LPS.



As microfotografias representam as análises dos cinco grupos (Salina, LPS, DEXA, JR17 e JR18). LPS versus outros grupos * $p < 0,0001$. A escala de barra = 50 µm.

Figura 28 - Análise imuno-histoquímica da Sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) no modelo de lesão pulmonar induzida por LPS.

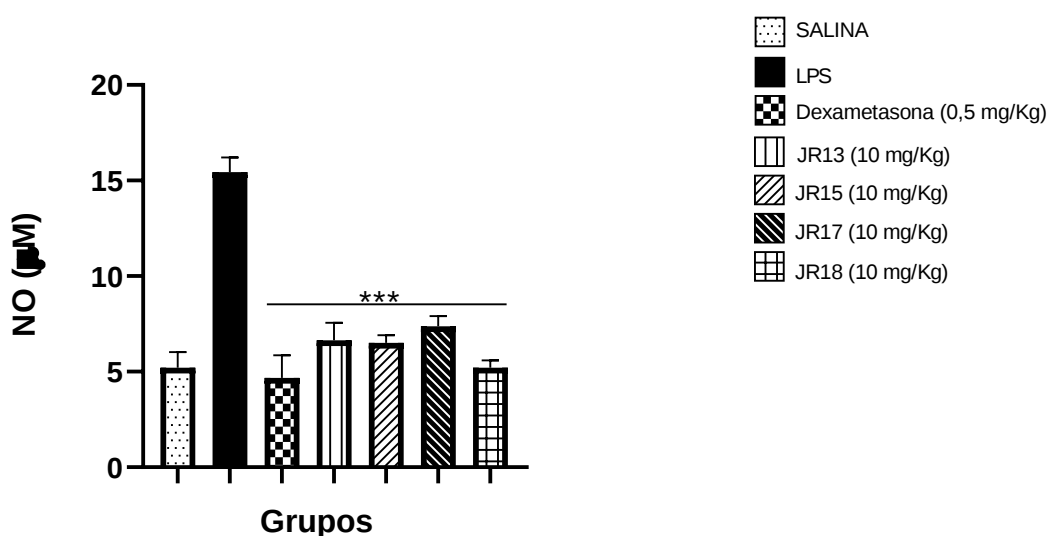


As microfotografias representam as análises dos cinco grupos (Salina, LPS, DEXA, JR17 e JR18). LPS versus outros grupos * $p < 0,0001$.

5.2.2.4 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

A quantidade de NO acumulada no exsudato do LBA, foi quantificada visando chegar até os mediadores inflamatórios produzidos durante o processo inflamatório e um possível efeito das substâncias. O grupo LPS apresentou significativo aumento dos níveis de NO quando comparado ao grupo salina ($p < 0,001$) (Figura 29). Em contrapartida, o NO foi inibido significativamente nos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos e dexametasona ($***p < 0,001$).

Figura 29 - Quantificação indireta de NO pelos níveis de nitrato/nitrito no LBA dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona.



NO no lavado broncoalveolar $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo controle normal. $***p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo LPS. Significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo LPS.

O óxido nítrico é uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune. Nos processos de inflamação, a produção de NO aumenta consideravelmente e, juntamente com as espécies reativas de oxigênio (ERO) contribui para o estresse oxidativo. A análise dos metabólitos estáveis nitrato e nitrito foi realizada a partir da reação de Griess, onde o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, formando o composto diazo que reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rósea, utilizado para quantificar indiretamente o NO.

O NO desempenha um papel crucial no desenvolvimento da inflamação, apesar de atuar como um agente anti-inflamatório sob condições fisiológicas normais, poderia ser considerado um mediador pró-inflamatório que seria capaz de induzir a inflamação localizada no pulmão, devido ao aumento da secreção pulmonar. A óxido nítrico sintase indutível (iNOS) secreta o NO como mediador inflamatório, resultando em vasodilatação no local da inflamação causando edema. Assim, a inibição da produção de NO através da inibição da atividade da enzima iNOS e / ou expressão de proteínas pode ser uma abordagem útil para o tratamento da inflamação (GAMAL EL-DIN *et al.*, 2020). Os derivados *N*-acilhidrazônicos em estudo reduziram consideravelmente a produção de NO, quando comparados ao grupo LPS.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com a pesquisa de Cordeiro e colaboradores (2016), que em um modelo animal de inflamação indicaram que o pré-tratamento com os derivados de *N*-acilhidrazona reduziram em mais de 65% a produção de NO quando comparado ao grupo inflamado e sem tratamento.

O NO, que é considerado uma molécula crucial na inflamação aguda e crônica, também é secretado na LPA. Todos os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos em estudo mostraram efeito inibitório significativo nos níveis de NO quando comparados ao grupo tratado com LPS. Vários autores consideram que, qualquer célula do corpo pode produzir a enzima iNOS sob estímulos apropriados, por exemplo, quando exposta a LPS ou citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , gerando grandes quantidades de NO (CORDEIRO *et al.*, 2020a).

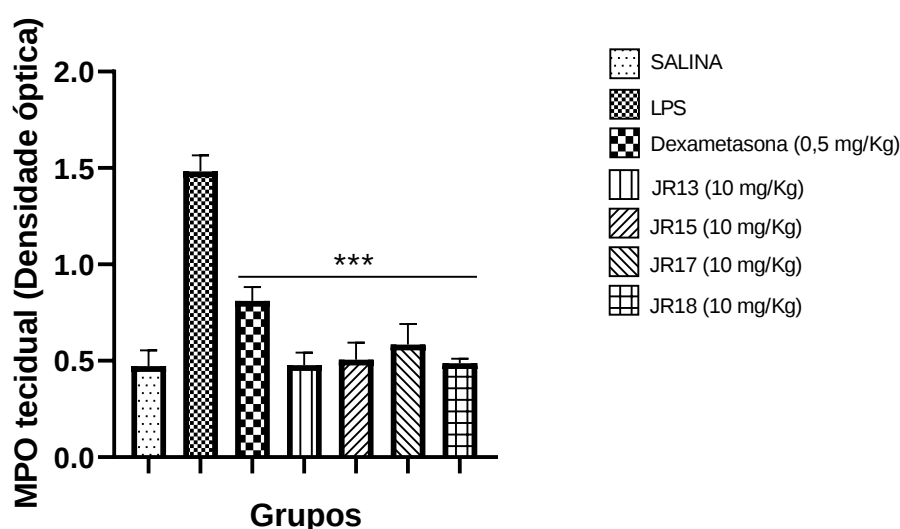
Todos os derivados *N*-acilhidrazônicos do nosso estudo reduziram significativamente o NO produzido no exsudato do LBA. Para investigar se esse efeito também poderia ser observado diretamente na célula, com isso planejamos realizar um ensaio *in vitro* para corroborar com os resultados *in vivo*.

5.2.2.5 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)

A ativação de neutrófilos é uma característica fisiopatológica essencial da resposta inflamatória. Conforme consta na Figura 30, havia excesso de MPO no tecido pulmonar após estimulação com LPS, indicando alta concentração de neutrófilos dentre as células provenientes do infiltrado inflamatório do tecido pulmonar. Os grupos

tratados com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos e dexametasona, apresentaram similar padrão de redução nos níveis desta enzima, quando comparados ao grupo LPS.

Figura 30 - Níveis de MPO tecidual nos pulmões dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona.



MPO no tecido pulmonar $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo controle normal. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo LPS. Significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo LPS.

Durante a ativação dos neutrófilos, o superóxido de espécies reativas de oxigênio é gerado pelo complexo NADPH oxidase associado à membrana. Por sua vez, forma peróxido de hidrogênio, que é usado pela enzima mieloperoxidase dos neutrófilos para gerar o potente oxidante ácido hipocloroso que contribui para a atividade antimicrobiana dos neutrófilos (OKADA *et al.*, 2016).

A mieloperoxidase pode ser um biomarcador da atividade dos neutrófilos, no entanto, possui a capacidade de causar considerável estresse oxidativo e danos nos tecidos através da produção de espécies reativas de oxigênio, como o ácido hipocloroso (CARR *et al.*, 2020). O ácido hipocloroso, uma espécie extremamente oxidante, é o principal produto da MPO, quando ambos estão aumentados, podem levar a danos teciduais graves (SANTOS *et al.*, 2020).

Na pesquisa, o grupo LPS apresentou nível elevado de MPO quando comparado aos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos e

dexametasona, os quais apresentaram redução dessa enzima e consequente redução do estresse oxidativo.

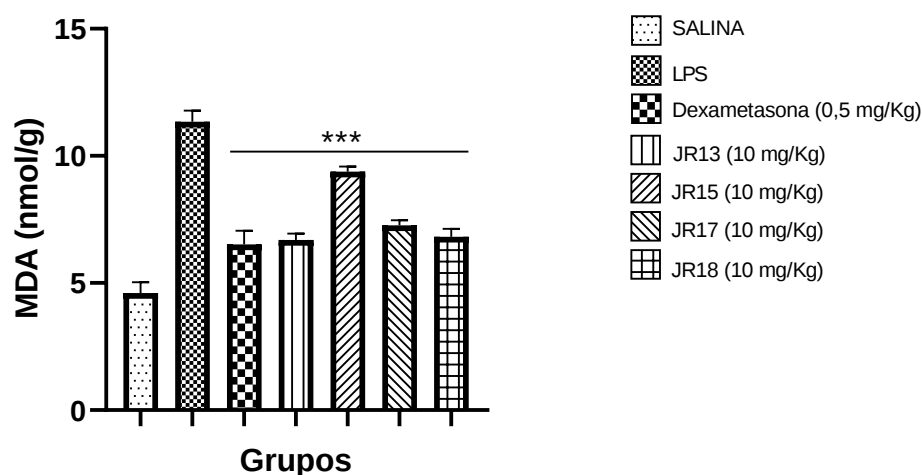
A inibição da atividade de MPO foi examinada empregando MPO de medula óssea de rato, foram testados quinze derivados de acil-hidrazona e dos quinze, cinco diminuíram a atividade da MPO em mais de 80 % (SANTOS *et al.*, 2020), este resultado corrobora com o nosso em relação a esses derivados inibirem a atividade da MPO.

Durante a progressão da LPA, os macrófagos alveolares residentes são primeiramente ativados para os macrófagos inflamatórios do tipo M1 que liberam citocinas pró-inflamatórias, ativando a resposta imune e recrutando os glóbulos brancos, como monócitos e neutrófilos, para o tecido inflamado (WOOD; KATARIA; MODRYKAMIEN, 2020). Posteriormente, os neutrófilos ativados liberam mediadores tóxicos, como ROS e MPO para matar e degradar os patógenos. Se os patógenos não puderem ser eliminados a tempo, os neutrófilos continuarão a liberar ROS, resultando em uma superprodução de ROS no tecido pulmonar inflamado. O alto nível de ROS não apenas induz lesão epitelial, mas também ativa a sinalização inflamatória e intensifica a resposta imune (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017). Portanto, reduzir o nível de ROS é uma maneira promissora de aliviar a inflamação pulmonar.

5.2.2.6 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

O grau de peroxidação lipídica dos pulmões foi estimado pela determinação dos níveis de malondialdeído através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido pulmonar. O estresse oxidativo gera produtos de oxidação lipídica, sendo o MDA, o produto secundário avaliado dessa oxidação. O grupo LPS apresentou níveis altos de MDA, confirmando um nível de estresse oxidativo aumentado e significativo quando comparado ao grupo salina com $p < 0,01$ e os grupos tratados com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos e dexametasona, apresentaram uma significativa redução quando comparados ao grupo LPS com $***p < 0,001$ (Figura 31).

Figura 31 - Níveis de TBARS no tecido pulmonar dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos (JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18) e dexametasona.



MDA no tecido pulmonar $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo controle normal. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo LPS. Significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo LPS.

O MDA é o produto da peroxidação lipídica, que pode causar a polimerização de ligações cruzadas de proteínas, ácidos nucleicos e outras biomacromoléculas e, portanto, possui citotoxicidade (ZHAI *et al.*, 2022). O conteúdo ou a atividade de indicadores importantes do estresse oxidativo, são produtos de peroxidação lipídica como MDA e interleucina-6, podem refletir o grau de peroxidação lipídica e a extensão do dano celular (GAO; TIAN; WANG, 2016).

No presente estudo, níveis elevados de MDA no tecido pulmonar foram observados no grupo LPS corroborando com o estudo de Gao e colaboradores (2016) que apresentou alterações nos níveis de MDA no tecido pulmonar de ratos submetidos a um modelo de edema pulmonar agudo induzido por hipóxia, mostrando que os níveis de MDA aumentaram no tecido pulmonar dos ratos após a indução de edema agudo de pulmão por 24 h. O MDA foi detectado no presente estudo, e os resultados demonstraram que o estresse oxidativo pode ter um papel importante na ocorrência de lesão pulmonar aguda e os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos apresentaram eficácia na redução dos níveis de MDA.

5.2.2.7 Dosagem de citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α

As citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α foram dosadas no homogenato do tecido pulmonar dos animais com Lesão pulmonar aguda induzida por LPS e tratadas com dexametasona e os derivados *N*-acilhidrazônicos JR-17 e JR-18. A dosagem foi realizada apenas no homogenato do tecido pulmonar dos animais tratados com esses derivados porque esses, apresentaram maior porcentagem de inibição da inflamação em relação aos outros derivados em estudo.

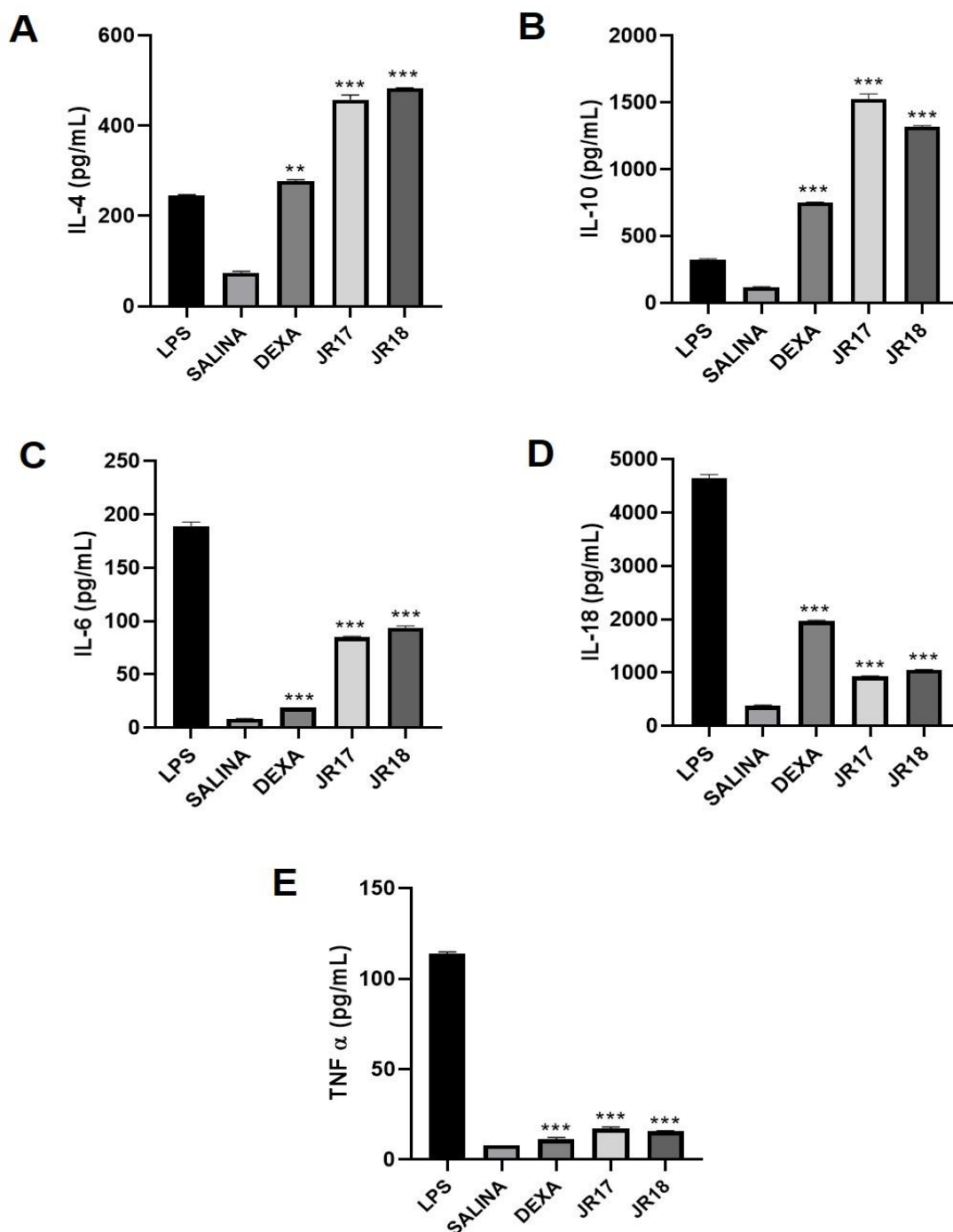
A figura 32 (A – E), apresenta os resultados da dosagem das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α respectivamente. Os derivados JR-17 e JR-18 e a dexametasona reduziram significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-18 e TNF- α quando comparados ao grupo LPS, ocorreu uma redução da produção e liberação de mediadores inflamatórios no processo de LPA induzido por LPS. Por outro lado, os derivados JR-17 e JR-18 aumentaram significativamente a secreção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10.

Os macrófagos estimulados pelo LPS são polarizados para o fenótipo pró-inflamatório M1 este, secreta citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 que são substanciais no início e progressão da inflamação na LPA. As amostras de tecidos pulmonares exibiram um alto nível de secreção de citocinas após 24 horas, que foi atenuada pela dexametasona e pelos derivados JR-17 e JR-18, sugerindo a polarização mais forte dos macrófagos de M1 para M2. Por outro lado, os derivados JR-17 e JR-18 aumentaram significativamente a secreção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, e mostraram notável repolarização de macrófagos no fenótipo M2 pela regulação positiva desses níveis de citocinas.

Estes resultados corroboram com Moraes e colaboradores (2018) que apresentaram uma pesquisa em que um derivado *N*-acilhidrazônico aumentou os níveis da citocina IL-4 e IL-10 em modelo de inflamação também induziu baixa liberação de óxido nítrico, um mediador chave da resposta inflamatória. A citocina IL-4 é anti-inflamatória, seu recrutamento têm a função primária de reduzir a inflamação e é desencadeado pela ativação das células Th1 (TSCHOE *et al.*, 2020).

As citocinas são as principais moléculas sinalizadoras liberadas pelas células inflamatórias e estão envolvidas em diversas funções, podem ser pró-inflamatórias como a IL-6, IL-18 e TNF- α e anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-10.

Figura 32 - Níveis de Citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α no tecido pulmonar dos animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS e após tratamento com os novos derivados N-acilhidrazônicos substituídos JR-17 e JR-18 e dexametasona.



Citocinas dosadas no tecido pulmonar $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo controle normal. Os dados são expressos como média $\pm$ SD *** $p < 0,001$ vs grupo LPS Significativo após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo LPS. (A) IL-4, (B) IL-10, (C) IL-6 (D) IL-18 e (E) TNF α .

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e mastócitos e é um dos primeiros e mais importantes mediadores inflamatórios conhecido por ter múltiplos papéis na resposta inflamatória, incluindo ativação de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas da via de síntese de prostaglandinas (COX2) e indução o óxido nítrico sintase (iNOS), levando à ativação endotelial e leucocitária (ZHAO *et al.*, 2021).

Os resultados corroboram com pesquisas independentes de Cordeiro e colaboradores (2016a) e Mota e colaboradores (2019), onde derivados *N*-acilhidrazônicos reduziram a produção de NO e TNF- α em modelos de inflamação aguda.

A IL-18 desempenha papéis importantes na lesão pulmonar, os níveis plasmáticos de IL-18 estão elevados em pacientes com sepse / SDRA, que é a forma grave de LPA. A inibição da IL-18 melhora a lesão de reperfusão cardíaca, isquemia renal e inflamação sistêmica induzida por endotoxina (ZHANG *et al.*, 2018). Portanto, IL-18 é um importante alvo terapêuticos para reduzir o dano tecidual e manter a homeostase imunológica após a exposição ao LPS (JIA *et al.*, 2019). Os derivados em estudo JR-17 e JR-18 apresentaram uma diminuição significativa, maior que a dexametasona, nos níveis de IL-18 quando comparados ao grupo LPS.

A LPA/SDRA é caracterizada por inflamação difusa do pulmão, o controle da inflamação é uma estratégia promissora para o tratamento, as espécies reativas de oxigênio que são geradas na LPA são um importante ativador do inflamassoma NLRP3 (KELLNER *et al.*, 2017). A LPA induzida por LPS simula o principal processo patológico observado durante a SDRA, incluindo secreção de proteínas inflamatórias, infiltração de neutrófilos e alterações na lesão endotelial e controlar a progressão da doença de leve a grave pode ser um diferencial no manejo da COVID-19 (BAI *et al.*, 2022).

Neste contexto, os estudos farmacológicos buscam descobrir novos alvos e desenvolver drogas capazes de inibir além da liberação e / ou produção de pró-inflamatórios como as citocinas e quimiocinas, as proteínas envolvidas na atração e transmigração de leucócitos para o foco inflamatório (WANG *et al.*, 2020). Devido a ampla gama de propriedades farmacológicas e fácil obtenção, as hidrazonas tem sido um grupo funcional bastante atrativo.

No estudo de Cordeiro e colaboradores (2020) foi avaliado a atividade anti-inflamatória de uma nova *N*-acilhidrazona sintetizada, LASSBio-1828 (uma aminopiridinil - *N*- acilhidrazona), e foi observado que o tratamento com a mesma,

inibiu o p38 α , reduziu a dor inflamatória, a migração celular e os mediadores inflamatórios TNF- α e IL-1 β , que participam da via MAPK.

A resposta leucocitária à lesão pulmonar aguda é complexa, mas envolve rápido recrutamento de neutrófilos circulantes e ativação de macrófagos alveolares (NIEMIEC *et al.*, 2022).

Bai e colaboradores (2022) investigaram em um modelo animal de LPA induzida por LPS, o mecanismo protetor de Keguan-1 (medicina tradicional chinesa) na SDRA, esse modelo foi usado para simular o estado patológico da SDRA em pacientes com COVID-19, com foco em seu efeito e mecanismo na LPA, seus resultados demonstraram que Keguan-1 pode melhorar a LPA induzida por LPS, reduzindo a inflamação e a lesão endotelial vascular pulmonar, fornecendo suporte científico para o tratamento clínico de pacientes com COVID-19.

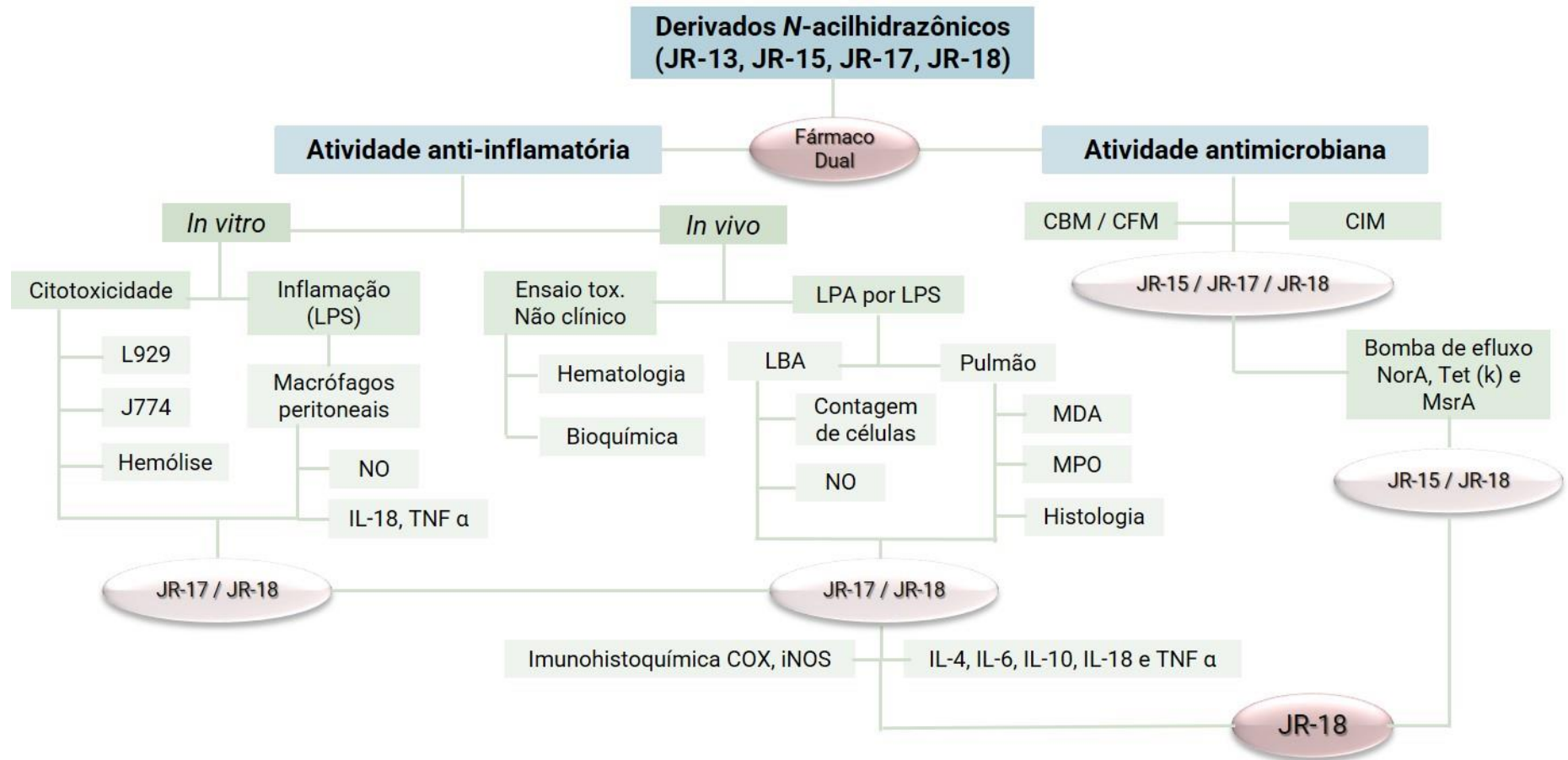
Wanderley e colaboradores (2020), sabendo que a subunidade *N*-acilhidrazona ser considerada uma estrutura privilegiada na química medicinal e sua importância na pesquisa farmacêutica apresentaram um estudo onde encapsularam JR19, uma subunidade de *N*-acilhidrazonas, em películas de quitosana e avaliaram várias propriedades relevantes para entrega transdérmica, incluindo biocompatibilidade utilizando testes *in vitro*, e demonstraram que o filme quitosana + JR19 influenciou positivamente as propriedades mecânicas e conferiu melhor compatibilidade com ambientes biológicos, mostrando potencial para tratar a inflamação cutânea.

A chave para o manejo da COVID-19 é prevenir a ocorrência de Lesão pulmonar aguda / Síndrome do desconforto respiratório agudo e controlar a progressão da doença de leve a grave. Demonstramos que a administração de *N*-acilhidrazonas, mais especificamente, JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 atenuaram a indução de várias características patogênicas importantes da lesão pulmonar aguda, danos induzidos pelo LPS, incluindo inflamação das vias aéreas e migração de células polimorfonucleares. Estes resultados identificam e destacam na atividade anti-inflamatória os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos e, em particular, JR-17 e JR-18 que apresentaram resultados mais promissores, pois inibiram significativamente a infiltração de células inflamatórias e a liberação de fatores inflamatórios como as citocinas IL-4, IL-6, IL-18 e TNF α , em camundongos com LPA *in vivo*.

Um fármaco dual agregando duas atividades farmacológicas, anti-inflamatória e antimicrobiana, seria uma alternativa promissora para tratamento de Lesão

pulmonar aguda / Síndrome do desconforto respiratório agudo, já que, a mesma, tem a sepse como patologia precursora com maior taxa de mortalidade. Os resultados de atividade antimicrobiana e inibidores de bomba de efluxo apresentaram maior destaque para os derivados JR-15 e JR-18. Sendo assim, de acordo com a perspectiva de obtenção de um fármaco dual, o JR-18 foi destaque entre os outros derivados *N*-acilhidrazônicos testados neste estudo (Figura 33), pois agregou resultados significativos tanto para atividade anti-inflamatória como para atividade antimicrobiana.

Figura 33 - Fluxograma com a evolução da pesquisa.



Fonte: a autora.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- Na atividade antimicrobiana, os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos JR-13, JR-15, JR-17 e JR-18 em estudo demonstraram atividade diante das cepas bacterianas e de leveduras testadas;
- O derivado *N*-acilhidrazônico JR-15 apresentou efeito sinérgico em associação com a norfloxacin frente a cepa de *S. aureus* SA-1199B e em associação a tetraciclina frente a cepa *S. aureus* SA IS-58 podendo ter inibido as bombas de efluxo NorA e Tet(k) respectivamente;
- O derivado *N*-acilhidrazônico JR-17 apresentou efeito sinérgico em associação ao brometo de etídio frente a cepa de *S. aureus* SA-1199 demonstrando assim potencial como um possível inibidor de bomba NorA;
- O derivado *N*-acilhidrazônico JR-18 apresentou efeito sinérgico em associação ao brometo de etídio frente as cepas de *S. aureus* SA-1199 e SA-RN4220 e em associação com a norfloxacin frente a cepa de *S. aureus* SA-1199B demonstrando assim potencial como um possível inibidor das bombas de efluxo NorA e MsrA;
- Os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos não causaram danos às membranas dos eritrócitos de camundongos e não apresentaram efeitos citotóxicos nas células testadas;
- Os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos apresentaram atividade anti-inflamatória *in vitro* através da inibição da produção de NO e das citocinas inflamatórias IL-18 e TNF α ;
- No ensaio toxicológico não clínico, os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos não apresentaram morte nem alterações significantes nos parâmetros analisados capazes de inferir toxicidade;
- Os novos derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos reduziram a quantidade de neutrófilos e inibiram significativamente a inflamação na Lesão Pulmonar Aguda induzida por LPS, mostrada através das porcentagens de inibição da inflamação, com destaque para o JR-17 e JR-18;

- Nas análises histológicas do tecido pulmonar dos animais, foi possível observar que nos tratados com JR-13 e JR-15, ocorreu uma diminuição da presença de infiltrado leucocitário e discreta diminuição da espessura da parede alveolar. E nos tratados com JR-17 e JR-18, ocorreu diminuição do dano alveolar com reestruturação tecidual;
- Os derivados JR17 e JR18 diminuíram a reatividade para os marcadores COX-2 e iNOS, o que indica uma diminuição no processo inflamatório em relação com o grupo LPS.
- A quantidade de NO acumulada no LBA foi inibida significativamente nos grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos;
- Os grupos tratados com os derivados *N*-acilhidrazônicos apresentaram um padrão de redução similar a dexametasona nos níveis da mieloperoxidase e reduziram significativamente os níveis de malondialdeído nos pulmões dos animais quando comparados ao grupo LPS;
- Os derivados JR17 e JR18 diminuíram os níveis das citocinas inflamatórias IL-6, IL-18 e TNF- α e aumentaram os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10;
- O derivado *N*-acilhidrazônico JR-18 apresentou resultados mais promissores diante dos outros derivados testados em relação a capacidade dual, pois agrega resultados relevantes em relação as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE, M. N. M. **The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- ABEDI, F.; HAYES, A. W.; REITER, R.; KARIMI, G. **Acute lung injury: The therapeutic role of Rho kinase inhibitors.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104736>
- ALGANDABY, M. M. Assessment of acute and subacute toxic effects of the Saudi folk herb Retama raetam in rats. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, n. 12, p. 691–701, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.06.011>
- ALIZADEH-TABRIZI, N.; HALL, S.; LEHMANN, C. **Intravital Imaging of Pulmonary Immune Response in Inflammation and Infection.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.620471>
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R.; BOYD, M. R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Research**, v. 48, n. 3, p. 584–588, 1988.
- ALMATAR, M.; ALBARRI, O.; MAKKY, E. A.; KÖKSAL, F. **Efflux pump inhibitors: new updates.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00160-9>
- AYRES, J. S. A metabolic handbook for the COVID-19 pandemic. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 7, p. 572–585, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0237-2>
- BAI, Z. *et al.* Inhibitory effects and mechanisms of the anti-covid-19 traditional Chinese prescription, Keguan-1, on acute lung injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 285, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114838>
- BAIGENT, C. *et al.* Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Meta-analyses of individual participant data from randomised trials. **The Lancet**, v. 382, n. 9894, p. 769–779, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60900-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60900-9)
- BHATTACHARJEE, B. B.; DEPARTMENT OF BIOSCIENCES AND BIOENGINEERING, INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY GUWAHATI, GUWAHATI 781039, I.; BHATTACHARJEE, M. by B.; , ASESH DAS, GOPAL DAS*, and A. R. Urea-Based Ligand as an Efflux Pump Inhibitor: Warhead to Counter Ciprofloxacin Resistance and Inhibit Collagen Adhesion by MRSA. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 4, p. 1710–1720, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00092>
- BOCHAROV, A. V.; WU, T.; BARANOVA, I. N.; BIRUKOVA, A. A.; SVIRIDOV, D.;

VISHNYAKOVA, T. G.; REMALEY, A. T.; EGGERMAN, T. L.; PATTERSON, A. P.; BIRUKOV, K. G. Synthetic Amphipathic Helical Peptides Targeting CD36 Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 2, p. 611–619, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401028>

BRADLEY, P.; CHRISTENSEN, R.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–622, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.v60.3.618.bloodjournal603618>

BRANCO, A. C. C. C.; YOSHIKAWA, F. S. Y.; PIETROBON, A. J.; SATO, M. N. **Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/9524075>

BUSCH, C. J.; BINDER, C. J. **Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2016.06.016>

CABRERA, R. *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains from the endotracheal tubes of patients with nosocomial pneumonia. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 43, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0679-z>

CALDIROLI, A.; AUXILIA, A. M.; CAPUZZI, E.; CLERICI, M.; BUOLI, M. **Malondialdehyde and bipolar disorder: A short comprehensive review of available literature**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.05.001>

CAO, G. J.; FISHER, C. M.; JIANG, X.; CHONG, Y.; ZHANG, H.; GUO, H.; ZHANG, Q.; ZHENG, J.; KNOLHOFF, A. M.; CROLEY, T. R.; YIN, J. J. Platinum nanoparticles: An avenue for enhancing the release of nitric oxide from: S -nitroso- N -acetylpenicillamine and S -nitrosoglutathione. **Nanoscale**, v. 10, n. 23, p. 11176–11185, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8nr03874k>

CARR, A. C.; SPENCER, E.; HOSKIN, T. S.; ROSENGRAVE, P.; KETTLE, A. J.; SHAW, G. Circulating myeloperoxidase is elevated in septic shock and is associated with systemic organ failure and mortality in critically ill patients. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 462–468, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.004>

CARRILLO, J. C.; ADENUGA, M. D.; MCKEE, R. H. The sub-chronic toxicity of regular White Spirit in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 222–230, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.07.007>

CASTILLO-BEJARANO, J. I.; TAMEZ-RIVERA, O.; MIRABAL-GARCÍA, M.; LUENGAS-BAUTISTA, M.; MONTES-FIGUEROA, A. G.; FORTES-GUTIÉRREZ, S.; GONZÁLEZ-SALDAÑA, N. Invasive Candidiasis Due to *Candida guilliermondii* Complex: Epidemiology and Antifungal Susceptibility Testing From a Third-Level Pediatric Center in Mexico. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, n. 3, p. 404–406, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jpids/piaa043>

CERQUEIRA, J. V.; MEIRA, C. S.; SANTOS, E. de S.; DE ARAGÃO FRANÇA, L. S.; VASCONCELOS, J. F.; NONAKA, C. K. V.; DE MELO, T. L.; DOS SANTOS FILHO, J.

M.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Anti-inflammatory activity of SintMed65, an N-acylhydrazone derivative, in a mouse model of allergic airway inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105735, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105735>

CHOWDHARY, A.; SHARMA, A. The lurking scourge of multidrug resistant *Candida auris* in times of COVID-19 pandemic. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 175–176, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.003>

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. **TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>

CILLÓNIZ, C.; DOMINEDÒ, C.; TORRES, A. **Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Community-Acquired Pneumonia**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2371-3>

CINELLI, M. A.; DO, H. T.; MILEY, G. P.; SILVERMAN, R. B. **Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.21599>

COIMBRA, E. S.; NORA DE SOUZA, M. V.; TERROR, M. S.; PINHEIRO, A. C.; DA TRINDADE GRANATO, J. Synthesis, biological activity, and mechanism of action of new 2-pyrimidinyl hydrazone and N-acylhydrazone derivatives, a potent and new classes of antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 184, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111742>

CONTI, P.; RONCONI, G.; CARAFFA, A.; GALLENGA, C. E.; ROSS, R.; FRYDAS, I.; KRITAS, S. K. **Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.23812/CONTI-E>

CORALINA, Cora. Poemas: dos becos de Goiás e Estórias Mais. 1a. edição. Rio de Janeiro: Livraria José Olympio Editôra, 1965.

CORDEIRO, N. de M.; FREITAS, R. H. C. N.; FRAGA, C. A. M.; FERNANDES, P. D. New 2-amino-pyridinyl-N-acylhydrazones: Synthesis and identification of their mechanism of anti-inflammatory action. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109739, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109739>

CORDEIRO, N.; FREITAS, R. H. C. N.; FRAGA, C. A. M.; FERNANDES, P. D. Therapeutic Effects of Anti-Inflammatory N -Acylhydrazones in the Resolution of Experimental Colitis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 374, n. 3, p. 420–427, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000074>

CORDEIRO, N. M.; FREITAS, R.; FRAGA, C. A. M.; FERNANDES, P. D. Discovery of Novel Orally Active Tetrahydro-Naphthyl-N-Acylhydrazones with In Vivo Anti-TNF- α Effect and Remarkable Anti-Inflammatory Properties. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156271>

CORDEIRO, N. M.; FREITAS, R. H. C. N.; FRAGA, C. A. M.; FERNANDES, P. D. Discovery of novel orally active tetrahydro-naphthyl-N-acylhydrazones with in vivo anti-

TNF- α effect and remarkable anti-inflammatory properties. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016
b. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156271>

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231–1234, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00128-9)

CZAJA, A. J. **Immune Inhibitory Properties and Therapeutic Prospects of Transforming Growth Factor-Beta and Interleukin 10 in Autoimmune Hepatitis.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10620-021-06968-6>

DA SILVA MONTEIRO, C. E.; FRANCO, Á. X.; SOUSA, J. A. O.; MATOS, V. E. A.; DE SOUZA, E. P.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; DE SOUZA, M. H. L. P.; SOARES, P. M. G.; BARBOSA, A. L. R. Gastroprotective effects of N-acylarylhydrazones derivatives on ethanol-induced gastric lesions in mice are dependent on the NO/cGMP/KATP pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 169, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113629>

DA SILVA MOURA, W. C., PEREIRA, D. N., LIMA, Z. N., & DE MOURA, R. O. ANTIBACTERIAL PROFILE OF NEW REPLACED N-ACYLYDRAZONE DERIVATIVES. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 13, n. 4, 2018.

DANTAS, N.; DE AQUINO, T. M.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DA SILVA-JÚNIOR, E.; GOMES, E. A.; GOMES, A. A. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-Biological Interactions**, v. 280, p. 8–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.009>

DIAS VIEGAS, F. P. *et al.* Design, synthesis and pharmacological evaluation of N - benzyl-piperidiny-aryl-acylhydrazones derivatives as donepezil hybrids: Discovery of novel multi-target anti-alzheimer prototype drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 48–65, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.066>

ELSAID, A.; SHOAIB, R. M. S.; BADR, S. S.; WAHBA, Y.; AYYAD, S. E. N. Polymorphisms of interleukin 4 and interleukin 4 receptor genes and bronchial asthma risk among Egyptian children. **Clinical Biochemistry**, v. 93, p. 66–72, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.04.006>

ETIENNE, R.; VIEGAS, F. P. D.; VIEGAS JR., C. Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação e o Planejamento de Fármacos: uma Visão Geral Atualizada. **REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA**, v. 13, n. 1, p. 167–191, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200138>

FANONI, D.; VENEGONI, L.; VERGANI, B.; TAVECCHIO, S.; CATTANEO, A.; LEONE, B. E.; BERTI, E.; MARZANO, A. V. Evidence for a role of autoinflammation in early-phase psoriasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 198, n. 3, p. 283–291,

2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cei.13370>

FEITO, M. J.; DIEZ-OREJAS, R.; CICUÉNDEZ, M.; CASARRUBIOS, L.; ROJO, J. M.; PORTOLÉS, M. T. Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 176, p. 96–105, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.063>

FIGUEREDO, F. G. *et al.* Inhibition of Staphylococcus aureus TetK and MsrA efflux pumps by hydroxyamines derived from lapachol and norlachol. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 53, n. 2, p. 149–156, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09885-5>

FREITAS, R. H. C. N.; CORDEIRO, N. M.; CARVALHO, P. R.; ALVES, M. A.; GUEDES, I. A.; VALERIO, T. S.; DARDENNE, L. E.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; FERNANDES, P. D.; FRAGA, C. A. M. Discovery of naphthyl- N -acylhydrazones p38 α MAPK inhibitors with in vivo anti-inflammatory and anti-TNF- α activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 2, p. 391–397, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cbdd.13085>

GAMAL EL-DIN, M. M.; EL-GAMAL, M. I.; ABDEL-MAKSoud, M. S.; LEE, H.; CHOI, J.; KIM, T. W.; SHIN, J. S.; LEE, H. H.; KIM, H. K.; LEE, K. T.; BAEK, D. Inhibitory effects of triarylpyrazole derivatives on LPS-induced nitric oxide and PGE2 productions in murine RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126884>

GAO, H.; TIAN, Y.; WANG, W. Levels of interleukin-6, superoxide dismutase and malondialdehyde in the lung tissue of a rat model of hypoxia-induced acute pulmonary edema. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 3, p. 993–997, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2962>

GERMOLEC, D. R.; SHIPKOWSKI, K. A.; FRAWLEY, R. P.; EVANS, E. Markers of Inflammation. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 57–79. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5

GHASEMI, F.; BAGHERI, H.; BARRETO, G. E.; READ, M. I.; SAHEBKAR, A. **Effects of Curcumin on Microglial Cells**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00030-0>

GHAZAVI, A.; GANJI, A.; KESHAVERZIAN, N.; RABIEMAJD, S.; MOSAYEBI, G. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**, v. 137, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155323>

GILBERT, N. C.; GERSTMEIER, J.; SCHEXNAYDRE, E. E.; BÖRNER, F.; GARSCHA, U.; NEAU, D. B.; WERZ, O.; NEWCOMER, M. E. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. **Nature Chemical Biology**, v. 16, n. 7, p. 783–790, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0544-7>

GORANTLA, V.; GUNDLA, R.; JADAV, S. S.; ANUGU, S. R.; CHIMAKURTHY, J.; NIDASANAMETLA, S. K.; KORUPOLU, R. Molecular hybrid design, synthesis and biological evaluation of N-phenyl sulfonamide linked N-acyl hydrazone derivatives functioning as COX-2 inhibitors: New anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial

agents. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 22, p. 13516–13532, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7nj03332j>

GRECO, I.; MOLCHANOVA, N.; HOLMEDAL, E.; JENSSEN, H.; HUMMEL, B. D.; WATTS, J. L.; HÅKANSSON, J.; HANSEN, P. R.; SVENSON, J. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>

GUEDES, I. A.; FREITAS, R. H. C. N.; CORDEIRO, N. M.; DO NASCIMENTO, T. S.; VALERIO, T. S.; FERNANDES, P. D.; DARDENNE, L. E.; FRAGA, C. A. M. LASSBio-1829 Hydrochloride: Development of a New Orally Active N-Acylhydrazone IKK2 Inhibitor with Anti-inflammatory Properties. **ChemMedChem**, v. 11, n. 2, p. 234–244, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500266>

GUIMARÃES, E. T.; DOS SANTOS, T. B.; SILVA, D. K. C.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; DA SILVA, T. F.; SALMON, D.; BARREIRO, E. J.; SOARES, M. B. P. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. **International Immunopharmacology**, v. 65, p. 108–118, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.09.047>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HARIKRISHNAN, H.; JANTAN, I.; HAQUE, M. A.; KUMOLOSASI, E. Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. Through inhibition of NF-KB, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2289-3>

HERRERO, R.; SÁNCHEZ, G.; ASENSIO, I.; LÓPEZ, E.; FERRUELO, A.; VAQUERO, J.; MORENO, L.; DE LORENZO, A.; BAÑARES, R.; LORENTE, J. A. Liver–lung interactions in acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 8, n. S1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00337-9>

HU, C. H. *et al.* Small molecule and macrocyclic pyrazole derived inhibitors of myeloperoxidase (MPO). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 42, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128010>

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

JAFARNEZHAD-ANSARIHA, F. *et al.* The effects of β -d-mannuronic acid (M2000), as a novel NSAID, on COX1 and COX2 activities and gene expression in ankylosing spondylitis patients and the murine monocyte/macrophage, J774 cell line. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 375–384, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0386-4>

JIA, X.; CAO, B.; AN, Y.; ZHANG, X.; WANG, C. Rapamycin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting IL-1 β and IL-18 production. **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 211–219, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.017>

JO, J. K.; EL-FIQLI, A.; LEE, J. H.; KIM, D. A.; KIM, H. W.; LEE, H. H. Rechargeable microbial anti-adhesive polymethyl methacrylate incorporating silver sulfadiazine-loaded mesoporous silica nanocarriers. **Dental Materials**, v. 33, n. 10, p. e361–e372, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.009>

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. **Cytokines in inflammatory disease**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>

KAPLANSKI, G. **Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12616>

KASSAB, A. A.; ABOREGELA, A. M.; SHALABY, A. M. Edaravone attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model: A histological, immunohistochemical and biochemical study. **Annals of Anatomy**, v. 228, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151433>

KELLNER, M.; NOONEPALLE, S.; LU, Q.; SRIVASTAVA, A.; ZEMSKOV, E.; BLACK, S. M. ROS Signaling in the Pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). In: [S. l.: s. n.]. p. 105–137. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_8

KHAN, A.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>

KHORRAMI, S.; ZAMANI, H.; HASANZADEH, M.; MEHRAMIZ, M.; SOLEIMANI, A.; ZARE MARZOUNI, H.; FERNS, G. A.; ESMAEILI, H.; AVAN, A. Association of a genetic variant in Interleukin-10 gene with increased risk and inflammation associated with cervical cancer. **Gene**, v. 807, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145933>

KIM, Y. M.; JEONG, S.; CHOE, Y. H.; HYUN, Y. M. **Two-photon intravital imaging of leukocyte migration during inflammation in the respiratory system**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.4266/acc.2019.00542>

KOCH, M. S.; DREWNOWSKI, B.; BUENO, B. F.; RICKLI, C.; BALZER, E. R.; NOVAK, R. S.; VELLOSA, J. C. R. ASPECTOS GERAIS DA MIELOPEROXIDASE E SEU ENVOLVIMENTO EM DOENÇAS: UMA BREVE REVISÃO. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28677–28691, 2021.

LAI, W. Y.; WANG, J. W.; HUANG, B. T.; LIN, E. P. Y.; YANG, P. C. A novel TNF- α -targeting aptamer for TNF- α -mediated acute lung injury and acute liver failure. **Theranostics**, v. 9, n. 6, p. 1741–1751, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/thno.30972>

ŁANOCHA-ARENDARCZYK, N.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; KOT, K.; GUTOWSKA, I.; KOLASA-WOŁOSIUK, A.; CHLUBEK, D.; KOSIK-BOGACKA, D.

Expression and activity of COX-1 and COX-2 in acanthamoeba sp.-infected lungs according to the host immunological status. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19010121>

LEE, C.; CHOI, W. J. **Overview of COVID-19 inflammatory pathogenesis from the therapeutic perspective**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01301-7>

LEE, I. T.; YANG, C. M. **Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/791231>

LI, L.; HUANG, Q.; WANG, D. C.; INGBAR, D. H.; WANG, X. Acute lung injury in patients with COVID-19 infection. **Clinical and Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 20–27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ctm2.16>

LI, X. *et al.* Zanubrutinib ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulating macrophage polarization. **International Immunopharmacology**, v. 111, p. 109138, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109138>

LIEBERMAN -, M. Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. **Basic medical biochemistry**, v. 4th, p. 222–269, 2017.

LIU, Y.; SUN, W.; LI, J.; CHEN, L.; WANG, Y.; ZHANG, L.; YU, L. Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019. **medRxiv**, p. 2020.02.17.20024166, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.20024166>

LIU, Z. feng; ZHENG, D.; FAN, G. chang; PENG, T.; SU, L. Heat stress prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells by blocking calpain/p38 MAPK signalling. **Apoptosis**, v. 21, n. 8, p. 896–904, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1263-0>

LUYT, C. E. *et al.* **Pulmonary infections complicating ARDS**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06292-z>

MAGRO, G. **SARS-CoV-2 and COVID-19: Is interleukin-6 (IL-6) the “culprit lesion” of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? SGP130Fc**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytox.2020.100029>

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *In*: 1962, **Lloydia**. [S. l.: s. n.] p. 320–332.

MANGUS, R. S.; FRIDELL, J. A.; KUBAL, C. A.; DAVIS, J. P.; JOSEPH TECTOR, A. Elevated alanine aminotransferase (ALT) in the deceased donor: Impact on early post-transplant liver allograft function. **Liver International**, v. 35, n. 2, p. 524–531, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/liv.12508>

MARINELLI, N. P.; ALBUQUERQUE, L. P. de A.; SOUSA, I. D. B. de; BATISTA, F. M. de A.; MASCARENHAS, M. D. M.; RODRIGUES, M. T. P. Evolução de indicadores e capacidade de atendimento no início da epidemia de COVID-19 no Nordeste do Brasil, 2020. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saúde do**

Brasil, v. 29, n. 3, p. e2020226, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000300008>

MEIRA, C. S. *et al.* Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1971–1985, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.047>

MOHANRAM, H.; BHATTACHARJYA, S. Salt-resistant short antimicrobial peptides. **Biopolymers**, p. 345–356, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bip.22819>

MONTEIRO, K. L. C.; DE AQUINO, T. M.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. An Update on Staphylococcus aureus NorA Efflux Pump Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 2168–2185, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568026620666200704135837>

MONTOYA, T.; CASTEJÓN, M. L.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; GONZÁLEZ-BENJUMEA, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. G.; ALARCÓN DE-LA-LASTRA, C. Oleocanthal Modulates LPS-Induced Murine Peritoneal Macrophages Activation via Regulation of Inflammasome, Nrf-2/HO-1, and MAPKs Signaling Pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 5552–5559, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00771>

MORAES, A. D. T. de O. *et al.* Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 20, p. 5388–5396, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.024>

MOSER, D.; BIERE, K.; HAN, B.; HOERL, M.; SCHELLING, G.; CHOUKÉR, A.; WOEHRLE, T. COVID-19 Impairs Immune Response to Candida albicans. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.640644>

MOTA, F. V. B. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity and molecular docking study of new aza-bicyclic isoxazoline acylhydrazone derivatives. **MedChemComm**, v. 10, n. 11, p. 1916–1925, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9MD00276F>

MOWERY, N. T.; TERZIAN, W. T. H.; NELSON, A. C. Acute lung injury. **Current Problems in Surgery**, v. 57, n. 5, p. 100777, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpsurg.2020.100777>

MUSOLINO, C.; ALLEGRA, A.; INNAO, V.; ALLEGRA, A. G.; PIOGGIA, G.; GANGEMI, S. **Inflammatory and Anti-Inflammatory Equilibrium, Proliferative and Antiproliferative Balance: The Role of Cytokines in Multiple Myeloma**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/1852517>

NASURUDDIN., S. H. D. N. Acute Inflammatory Response. **National Library of Medicine**, p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>, 2022.

NDREPEPA, G. **Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.022>

NGUYEN, Y.-L.; ANGUS, D. C.; BOUMENDIL, A.; GUIDET, B. The challenge of admitting the very elderly to intensive care. **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 1, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-29>

NI, W. *et al.* **Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>

NIEMIEC, S. M. *et al.* Lung function improves after delayed treatment with CNP-miR146a following acute lung injury. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 40, p. 102498, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102498>

OISHI, Y.; MANABE, I. **Macrophages in inflammation, repair and regeneration.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>

OKADA, S. S.; DE OLIVEIRA, E. M.; DE ARAÚJO, T. H.; RODRIGUES, M. R.; ALBUQUERQUE, R. C.; MORTARA, R. A.; TANIWAKI, N. N.; NAKAYA, H. I.; CAMPA, A.; MORENO, A. C. R. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: Production and subcellular localization. **Cellular Immunology**, v. 300, p. 18–25, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.11.003>

OSMANIYE, D.; LEVENT, S.; KARADUMAN, A.; ILGIN, S.; ÖZKAY, Y.; KAPLANCIKLI, Z. Synthesis of New Benzothiazole Acylhydrazones as Anticancer Agents. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1054, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23051054>

PALIOGIANNIS, P.; FOIS, A. G.; SOTGIA, S.; MANGONI, A. A.; ZINELLU, E.; PIRINA, P.; CARRU, C.; ZINELLU, A. Circulating malondialdehyde concentrations in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. **Biomarkers in Medicine**, v. 12, n. 7, p. 771–781, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0420>

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J.; CHENG, Z. **Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

PINTO, A. C. C.; ROCHA, D. A. S.; MORAES, D. C. D.; JUNQUEIRA, M. L.; FERREIRA-PEREIRA, A. Candida albicans clinical isolates from a southwest Brazilian tertiary hospital exhibit MFS-mediated azole resistance profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180654>

PRENCIPE, G.; BRACAGLIA, C.; DE BENEDETTI, F. **Interleukin-18 in pediatric rheumatic diseases.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000634>

RAJPUT, A.; SEIF, Y.; CHOUDHARY, K. S.; DALLDORF, C.; POUDEL, S.; MONK, J. M.; PALSSON, B. O. Pangenome Analytics Reveal Two-Component Systems as Conserved Targets in ESKAPEE Pathogens. **mSystems**, v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msystems.00981-20>

RANF, S. **Immune Sensing of Lipopolysaccharide in Plants and Animals: Same**

but Different. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005596>

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Canine and Feline Cytology: a Color Atlas and Interpretation Guide.** [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455740833000103>

REIS, S. L. G. B.; DE ALMEIDA, V. M.; DE ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, K. M.; MENDES, C. C. D. B.; DE FARIA, A. R.; GÓES, A. J. D. S.; MAGALHÃES, L. R.; DA SILVA, T. G. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 76–81, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000100015>

REZA, A.; MARK SUTTON, J.; RAHMAN, K. M. **Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram- negative (ESKAPEE) bacteria.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040229>

ROBB, C. T.; REGAN, K. H.; DORWARD, D. A.; ROSSI, A. G. **Key mechanisms governing resolution of lung inflammation.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0560-6>

ROBBINS. **Patologia Basica.** [S. l.: s. n.].

ROZADA, A. M. F.; RODRIGUES, F. A. V.; SAMPIRON, E. G.; SEIXAS, F. A. V.; BASSO, E. A.; SCODRO, R. B. L.; KIOSHIMA, É. S.; GAUZE, G. F. Novel 4-methoxynaphthalene-N-acylhydrazones as potential agents for the treatment of paracoccidioidomycosis and tuberculosis co-infection. **Future Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 587–598, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0357>

RUBÉN, ORLANDO; PÉREZ NIETO, ORLANDO; LÓPEZ, EDER IVÁN; SORIANO, RAUL; GUERRERO GUTIERREZ, MANUEL; ANTONIO, LUIS; VILLASEÑOR, MORGADO; SÁNCHEZ-DÍAZ, SALVADOR; DELOYA TOMAS, ERNESTO; JENNER, TOMAS; MARTÍNEZ, J. **Síndrome de distrés respiratorio agudo: Abordaje basado en evidencia.** [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32499.99362>

RUSSELL, C. D.; MILLAR, J. E.; BAILLIE, J. K. **Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury.** [S. l.: s. n.] Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30317-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30317-2)

SAHEBNASAGH, A.; MOJTAHEDZADEH, M.; NAJMEDDIN, F.; NAJAFI, A.; SAFDARI, M.; REZAI GHALENO, H.; HABTEMARIAM, S.; BERINDAN-NEAGOE, I.; NABAVI, S. M. **A Perspective on Erythropoietin as a Potential Adjuvant Therapy for Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Patients with COVID-19.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.002>

SANTOS, D. C.; HENRIQUES, R. R.; JUNIOR, M. A. de A. L.; FARIAS, A. B.; NOGUEIRA, T. L. do C.; QUIMAS, J. V. F.; ROMEIRO, N. C.; SILVA, L. L. da; SOUZA, A. L. F. de. Acylhydrazones as isoniazid derivatives with multi-target profiles for the treatment of Alzheimer's disease: Radical scavenging, myeloperoxidase/acetylcholinesterase inhibition and biometal chelation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115470>

SANTOS, L. A. M. dos; RODRIGUES, G. B.; MOTA, F. V. B.; FRANÇA, M. E. R. de; DE SOUZA BARBOSA, K. P.; OLIVEIRA, W. H. de; ROCHA, S. W. S.; LÓS, D. B.; SILVA, A. K. S.; SILVA, T. G. da; PEIXOTO, C. A. New thiazolidinedione LPSF/GQ-2 inhibits NFκB and MAPK activation in LPS-induced acute lung inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 57, p. 91–101, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.011>

SAUER, A.; PEUKERT, K.; PUTENSEN, C.; BODE, C. Antibiotics as immunomodulators: A potential pharmacologic approach for ARDS treatment. **European Respiratory Review**, v. 30, n. 162, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/16000617.0093-2021>

SERHAN, C. N. **Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201601222R>

SEUKEP, A. J.; KUETE, V.; NAHAR, L.; SARKER, S. D.; GUO, M. **Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. **Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside.** [S. l.: s. n.] Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17

SHEN, XIAOYAN; WANG, YANG; YIN, KAIYUE; SHENG, J. Research Progress on Biological Activities of N-Acylhydrazones in Recent Five Years. **International Journal Of Science**, v. 7, n. 8, p. 161–168, 2020. Disponível em: <http://www.ijscience.org/download/IJS-7-8-161-168.pdf>

SILVA, J. C. *et al.* LASSBio-1586, an N-acylhydrazone derivative, attenuates nociceptive behavior and the inflammatory response in mice. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0199009, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199009>

SILVA, S. C. da. Caracterização Farmacológica Pré-Clínica Da Atividade Antiinflamatória De Novos Derivados N-Acilhidrazônicos. p. 89, 2015. Disponível em: http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/16853/DISSERTAÇÃO_Sandra_Cabral_da_Silva.pdf?sequence=1&isAllowed=y

SILVA, S. C. da. **Efeitos de derivados acilhidrazônicos na inflamação pulmonar experimental por sensibilização química.** 2019. - Universidade Federal de Pernambuco, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/35313>

SOUJANYA, M.; RAJITHA, G.; UMAMAHESWARI, A.; KUMAR, K. S. Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies of N-(2-benzamido feruloyl) Aryl Hydrazone Analogues. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 15, n. 8, p. 875–886, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570180814666171026161041>

STANDIFORD, T. J.; WARD, P. A. **Therapeutic targeting of acute lung injury and**

acute respiratory distress syndrome. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.04.015>

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; ADRIANA HELENA CHICHARO VINHOLIS; WILSON ROBERTO CUNHA; MÁRCIO LUIS ANDRADE; SILVA, E.; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C. Comparative study of the recommended methodologies by clsi and eucast for activity evaluation antifungal. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498–502, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000200038>

SURESHBABU, A.; SYED, M.; DAS, P.; JANER, C.; PRYHUBER, G.; RAHMAN, A.; ANDERSSON, S.; HOMER, R. J.; BHANDARI, V. Inhibition of regulatory-Associated protein of mechanistic target of rapamycin prevents hyperoxia-induced lung injury by enhancing autophagy and reducing apoptosis in neonatal mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, n. 5, p. 722–735, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0349OC>

SWEATT, A. J.; LEVITT, J. E. **Evolving epidemiology and definitions of the acute respiratory distress syndrome and early acute lung injury.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.08.002>

SWENSON, K. E.; SWENSON, E. R. **Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.05.003>

SZABO, P. A. *et al.* Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 4, p. 797–814.e6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.005>

TAKENAKA, M.; YABUTA, A.; TAKAHASHI, Y.; TAKAKURA, Y. Interleukin-4-carrying small extracellular vesicles with a high potential as anti-inflammatory therapeutics based on modulation of macrophage function. **Biomaterials**, v. 278, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121160>

TAN, S.-Y.; WENINGER, W. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. **Current Opinion in Immunology**, v. 44, p. 34–42, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.11.002>

TARIGHI, P.; EFTEKHARI, S.; CHIZARI, M.; SABERNAVAEI, M.; JAFARI, D.; MIRZABEIGI, P. **A review of potential suggested drugs for coronavirus disease (COVID-19) treatment.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173890>

THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 562–572, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1608077>

THOTA, S.; RODRIGUES, D. A.; PINHEIRO, P. de S. M.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. **N-Acylhydrazones as drugs.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.015>

TINTINO, S. R. *et al.* Effect of vitamin K3 inhibiting the function of nora efflux pump

and its gene expression on staphylococcus aureus. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/membranes10060130>

TJONDRO, H. C. *et al.* Hyper-truncated Asn355- And Asn391-glycans modulate the activity of neutrophil granule myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016342>

TSCHOE, C.; BUSHNELL, C. D.; DUNCAN, P. W.; ALEXANDER-MILLER, M. A.; WOLFE, S. Q. **Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.5853/jos.2019.02236>

UEKI, H.; WANG, I. H.; FUKUYAMA, S.; KATSURA, H.; DA SILVA LOPES, T. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 28, p. E6622–E6629, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1806265115>

VANHAMME, L.; ZOUAOU BOUDJELTIA, K.; VAN ANTWERPEN, P.; DELPORTE, C. **The other myeloperoxidase: Emerging functions.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.037>

VASARMIDI, E.; TSITOURA, E.; SPANDIDOS, D.; TZANAKIS, N.; ANTONIOU, K. Pulmonary fibrosis in the aftermath of the Covid-19 era (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8980>

VLASOVA, I. I. Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. **Molecules**, v. 23, n. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23102561>

WANDERLEY, D. M. S. *et al.* Biocompatibility and mechanical properties evaluation of chitosan films containing an N-acylhydrazonic derivative. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 155, p. 105547, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105547>

WANG, C.; WANG, Y.; DENG, Q.; LIU, X. Synthesis of 4-methoxy-1, 3-benzenediolyldhydrazones and evaluation of their anti-platelet aggregation activity. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 4, p. 1803–1815, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100856>

WANG, H. M. D.; FU, L.; CHENG, C. C.; GAO, R.; LIN, M. Y.; SU, H. L.; BELINDA, N. E.; NGUYEN, T. H.; LIN, W. H.; LEE, P. C.; HSIEH, L. P. Inhibition of LPS-induced oxidative damages and potential anti-inflammatory effects of *Phyllanthus emblica* extract via down-regulating NF-κB, COX-2, and iNOS in raw 264.7 cells. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox8080270>

WANG, T.; GROSS, C.; DESAI, A. A.; ZEMSKOV, E.; WU, X.; GARCIA, A. N.; JACOBSON, J. R.; YUAN, J. X. J.; GARCIA, J. G. N.; BLACK, S. M. **Endothelial cell signaling and ventilator-induced lung injury: Molecular mechanisms, genomic analyses, and therapeutic targets.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00231.2016>

WEISSMANN, G. **Mediators of inflammation**. [S. l.: s. n.].

WHITTLE, E. E.; LEGOOD, S. W.; ALAV, I.; DULYAYANGKUL, P.; OVERTON, T. W.; BLAIR, J. M. A. Flow Cytometric Analysis of Efflux by Dye Accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02319>

WONG, A. W.; FIDLER, L.; MARCOUX, V.; JOHANNSON, K. A.; ASSAYAG, D.; FISHER, J. H.; HAMBLY, N.; KOLB, M.; MORISSET, J.; SHAPER, S.; RYERSON, C. J. **Practical Considerations for the Diagnosis and Treatment of Fibrotic Interstitial Lung Disease During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.019>

WONG, J.; MAGUN, B. E.; WOOD, L. J. **Lung inflammation caused by inhaled toxicants: A review**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.2147/COPD.S106009>

WOOD, C.; KATARIA, V.; MODRYKAMIEN, A. M. The acute respiratory distress syndrome. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 33, n. 3, p. 357–365, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08998280.2020.1764817>

WU, H.; XIAO, W.; ZHANG, K.; XUE, F.; ZHANG, C.; YAN, M.; WANG, X.; JIANG, S. Acute and subchronic toxicity of arprinocid in Sprague-Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 487–495, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.05.017>

WU, Z.; ZHANG, Z.; LEI, Z.; LEI, P. **CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.06.003>

XU, B.; CHEN, S. si; LIU, M. zhao; GAN, C. xia; LI, J. qi; GUO, G. hua. Stem cell derived exosomes-based therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A novel therapeutic strategy. **Life Sciences**, v. 254, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117766>

XU, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 2020 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)

YAMAZAKI, D. A. S.; ROZADA, A. M. F.; BARÉA, P.; REIS, E. C.; BASSO, E. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; SEIXAS, F. A. V.; GAUZE, G. F. Novel arylcarbamate-N-acylhydrazones derivatives as promising BuChE inhibitors: Design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 32, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115991>

YARGIÇOĞLU, P.; AĞAR, A.; GÜMÜŞLÜ, S.; BILMEN, S.; OĞUZ, Y. Age-related alterations in antioxidant enzymes, lipid peroxide levels, and somatosensory-evoked potentials: Effect of sulfur dioxide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 554–560, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002449900552>

YI-CHEN; WU, M. X.; JIE-LIU; MA, X. J.; SHI, J. L.; WANG, S. N.; ZHENG, Z. Q.; GUO, J. Y. Acute and sub-acute oral toxicity studies of the aqueous extract from radix, radix with cortex and cortex of Psammosilene tunicoides in mice and rats. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 213, p. 199–209, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.011>

YU, Z.; TANG, J.; KHARE, T.; KUMAR, V. **The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue?**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>

ZAMBON, M.; VINCENT, J. L. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. **Chest**, v. 133, n. 5, p. 1120–1127, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1378/chest.07-2134>

ZENG, M.; SANG, W.; CHEN, S.; CHEN, R.; ZHANG, H.; XUE, F.; LI, Z.; LIU, Y.; GONG, Y.; ZHANG, H.; KONG, X. 4-PBA inhibits LPS-induced inflammation through regulating ER stress and autophagy in acute lung injury models. **Toxicology Letters**, v. 271, p. 26–37, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.023>

ZHAI, Z.; OUYANG, W.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; XU, F.; GAO, C. Dexamethasone-loaded ROS-responsive poly(thioketal) nanoparticles suppress inflammation and oxidative stress of acute lung injury. **Bioactive Materials**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.047>

ZHANG, L. M.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, L.; FEI, C.; YI, Z. W.; DONG, L. Interleukin-18 binding protein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via suppression NF- κ B and activation Nrf2 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 3, p. 837–842, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.193>

ZHAO, H.; WU, L.; YAN, G.; CHEN, Y.; ZHOU, M.; WU, Y.; LI, Y. **Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>

ZHU, X.; WANG, B.; ZHANG, X.; CHEN, X.; ZHU, J.; ZOU, Y.; LI, J. Alpha-linolenic acid protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury through anti-inflammatory and anti-oxidative pathways. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104077>

ZUMLA, A.; NIEDERMAN, M. S. **Editorial: The explosive epidemic outbreak of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) and the persistent threat of respiratory tract infectious diseases to global health security**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000676>

ANEXO A – Comitê de ética em uso animal



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Ofício nº 07/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Teresinha Gonçalves da Silva**
 Centro de Biociências
 Departamento de Antibióticos/ UFPE
 processo nº **136/2019**

Certificamos que a proposta intitulada "**mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória de novos derivados *n*-acilidrazônicos substituídos**". registrado com o **136/2019** sob a responsabilidade da **Prof. Teresinha Gonçalves da Silva** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 17/12/2019

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2019 a março/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss e Camundongo Isogenico Balb/b
Nº de animais	Camundongos heterogenico (30) Camundongo isogenico (126)
Peso/idade	Camundongos heterogenico 25g/60dias Camundongo isogenico 25g/60 dias
Sexo	Machos (63) e Femea (93)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Antibioticos da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibioticos da UFPE.

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2343691

ANEXO B – Artigo publicado

➤ [Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.](#) 2022 Jul 29.

doi: 10.2174/1871523021666220729141608. Online ahead of print.

Effects of acylhydrazone derivatives on experimental pulmonary inflammation by chemical sensitization

Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos ¹, Sandra Cabral da Silva ¹, Pascal Marchand ²,
Fernanda Virgínia Barreto Mota ¹, Julyanne Cunha de Assis Correia ¹,
Jéssica de Andrade Gomes Silva ¹, George Torres de Lima ¹, Marllon Alex Santana ¹,
Willian Charles da Silva Moura ³, Vanda Lúcia Dos Santos ³, Ricardo Olímpio Moura ³,
Teresinha Gonçalves da Silva ¹

Affiliations + expand

PMID: 35909266 DOI: [10.2174/1871523021666220729141608](#)

Abstract

Background: Chronic lung diseases are characterized by airway inflammation and remodelling of the lung parenchyma that triggers considerable impairment of respiratory function.

Objective: In this study, two compounds belonging to the N-acylhydrazone class were evaluated, aiming to identify new therapeutic agents for pulmonary inflammatory diseases.

Materials and methods: The acute toxicity of 2-cyano-N'-(3-ethoxy-4-hydroxybenzylidene)-acetohydrazide (JR-12) and N'-benzylidene-2-cyano-3-phenylacrylohydrazide (JR09-Bz) was evaluated. Afterwards, they were tested in models of ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma and asthma, bleomycin-induced pulmonary fibrosis, in addition to mucolytic activity.

Results and discussion: The compounds did not show toxicity at the dose of 2,000 mg/kg and no animal died. On OVA-induced pleurisy, animals treated with JR-12 or JR09-Bz at a dose of 10 mg/kg (orally) showed significant inhibition of the leukocyte infiltrate in the bronchoalveolar lavage by 62.5% and 61.5%, respectively, compared to the control group. The compounds JR-12 and JR09-Bz were also active in blocking the allergic asthmatic response triggered by OVA, reducing the leukocyte infiltrate by 73.1% and 69.8%, respectively. Histopathological changes and mast cell migration in treated animals with JR-12 or JR09-Bz were similar to treatment with the reference drugs dexamethasone and montelukast. JR-12 and JR09-Bz also reversed airway remodeling in animals on the bleomycin-induced fibrosis model compared to the control group. Furthermore, it was observed that N-arylhydrazone derivatives showed expectorant and mucolytic activities, increasing mucus secretion by 45.6% and 63.8% for JR-12 and JR09-Bz, respectively.

Conclusion: Together, the results show that JR-12 and JR09-Bz showed promising activity against airway inflammation, as well as low toxicity.