



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS DERIVADOS DE
IMIDAZOPIRIDINAS (IMPs) PELA INIBIÇÃO DE TNF-ALFA

Brasília

2018

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS DERIVADOS DE
IMIDAZOPIRIDINAS (IMPs) PELA INIBIÇÃO DE TNF-ALFA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília

2018

JOSÉ ANTONIO FAGUNDES ASSUMPÇÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS DERIVADOS DE
IMIDAZOPIRIDINAS (IMPs) PELA INIBIÇÃO DE TNF-ALFA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Profa. Dra. Patrícia Elaine de Almeida (Membro Efetivo)

Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares (Membro Efetivo)

Prof. Dr. Marcelo Brígido (Membro Efetivo)

Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos (Membro Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor José Raimundo Côrrea pela oportunidade, orientação e por todos os ensinamentos. Pela confiança e liberdade quanto às minhas vontades. Agradeço também pela compreensão de meus próprios processos pessoais e pelas conversas, não só sobre ciência, mas sobre vida.

À minha família, pelo apoio incondicional durante todas as fases (e não foram poucas) desses quatro anos. Ao meu pai, por me permitir trilhar meus próprios caminhos e, novamente, pela teimosia com meu bem-estar. À minha mãe, pelo maior amor que existe no mundo. Pelos conselhos, pelas conversas sobre tudo, sobre a casa, o trabalho e o coração. À minha irmã pelo companheirismo nas horas necessárias, por me estender a mão nos momentos de necessidade e pela troca de confidências da vida de um doutorando. Agradeço, do fundo do meu coração, por tudo!

Aos amigos de longa data, Babi, Gisele e João, pessoas que, por mais distantes que estejam, sempre carrego comigo. Obrigado por estes valiosos anos da minha vida. Eu amo vocês ao máximo. Que nos momentos possíveis, saibamos aproveitar a companhia um do outro como sempre fizemos.

Aos meus companheiros, meus irmãos do dia-a-dia, Gabriel (ou Miguel), Yan, Lacerda, Lucas (ou Varginha) e Barbosa. Eu não sei o que seria de mim sem vocês. Não só por suportar todos os momentos, mas por me entender, por não quererem mudar quem sou, mas sim crescer ao meu lado. Obrigado por todas as histórias, por todos os sentimentos. Continuemos juntos, perto ou longe.

Aos colegas do laboratório, por toda a ajuda, em assuntos profissionais ou pessoais. Aos colegas do LIA, LIMI, GPRO e tantos outros laboratórios. Em especial, agradeço à Lorena, com quem compartilhei quase tudo. Espero que seus caminhos levem à felicidade sempre!

Ao meu modelo de professor, Cezar Martins de Sá, primeiro dos orientadores, que me deixa saudades, mas me inspira ainda agora e para sempre.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade e à CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O equilíbrio da inflamação é de extrema importância na mediação da resposta imune inata, sendo responsável pelo controle e desenvolvimento de várias doenças relacionadas à imunidade. Estas geralmente surgem de inflamação crônica, por excesso de sinalização pró-inflamatória que abrange diferentes caminhos e moléculas de sinalização. Um papel importante é desempenhado por citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α), que geralmente funciona como um iniciador da sinalização pró-inflamatória. A sua desregulação está amplamente associada ao desenvolvimento e progressão de patologias, como artrite reumatoide, psoríase e sepse. Inibidores de TNF- α surgiram como tratamento, mas encontraram dificuldades em especificidade, produção e eficiência. Com uma relação custo/benefício desfavorável das terapias anti-TNF- α atuais, surge a demanda por novos métodos de tratamento. A produção de pequenas moléculas inibidoras de citocinas se mostra como uma alternativa viável e promissora para o tratamento terapêutico. Uma classe de compostos, as imidazopiridinas mostram um espectro de aplicação muito amplo, incluindo a inibição da produção de TNF- α . Oito diferentes derivados de imidazopiridinas foram projetados e sintetizados com o objetivo de testar a atividade inibidora de TNF- α . Nosso objetivo é verificar a ação desses derivados na resposta inflamatória estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) e elucidar quais caminhos intracelulares envolvendo TNF- α são alterados com o uso dessas moléculas. Em nossas observações, o tratamento com LPS de células U-937 e macrófagos peritoneais induziu um aumento na produção de TNF- α , que foram inibidos pelo tratamento com os compostos 4B e 4J de maneira dose-dependente. Tais compostos agem de maneira diferencial na regulação da produção de TNF- α , atuando em particular na sinalização de vias intracelulares iniciadas pela interação entre o receptor *toll-like-4*(TLR4) e seu ligante. Imidazopiridinas foram capazes de inibir o produto final desta via, a ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B), atuando também sobre proteínas e quinases acessórias, bem como em vias de cAMP e óxido nítrico. Estes resultados indicam que imidazopiridinas podem ser utilizadas como agentes terapêuticos e abre horizontes para estudos sobre sua estrutura e o desenvolvimento de compostos promissores para o tratamento de patologias inflamatórias.

Palavras-chave: inflamação, TNF-alfa, imidazopiridinas, LPS, sepse

ABSTRACT

The balance between pro- and anti-inflammatory events is crucial for the regulation of the innate immunity, accounting for the control and development of several immunity-related diseases. These diseases arise from chronic inflammation, through excessive pro-inflammatory signaling, including a range of different pathways and signaling molecules. An important role is played by cytokines, including tumor necrosis factor (TNF- α), which generally acts as the starter of the pro-inflammatory signaling network. Its deregulation is widely involved in the development and progression of diseases as rheumatoid arthritis, psoriasis and sepsis. TNF- α inhibitors emerged as a plausible treatment, but encountered obstacles like specificity, high costs and efficiency. Showing an unfavorable cost/benefit ratio of the current anti-TNF- α therapies, a demand for new treatment methods has arisen. The development of small molecules acting as cytokine inhibitors is a viable and promising alternative for therapeutic treatment. A class of compounds, imidazopyridines, show a very broad application spectrum, including inhibition of TNF- α synthesis. Eight different imidazopyridine derivatives were designed and synthesized aiming for the inhibitory activity of TNF- α . Our goal is to verify the action of these derivatives on the inflammatory response stimulated by lipopolysaccharides (LPS) and to elucidate which intracellular pathways involving TNF- α are altered with the use of these molecules. In our observations, LPS treatment of U-937 cells and peritoneal macrophages induced an increase in TNF- α production, which were inhibited by the treatment with compounds 4B and 4J in a dose-dependent manner. Such compounds act differentially in the regulation of TNF- α production, particularly in the signaling of intracellular pathways initiated by the interaction between toll-like receptor-4 TLR4 and its ligand. Imidazopyridines were able to inhibit the product of this pathway, the activation of nuclear factor kappa B (NF κ B), also acting on related proteins and kinases, as well as on cAMP and nitric oxide pathways. These results not only indicate that imidazopyridines can be used as therapeutic agents, as it opens horizons for studies on the architecture of such molecules and the development of promising compounds for the treatment of inflammatory conditions.

Keywords: inflammation, TNF-alpha, imidazopyridines, LPS, sepsis

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo da descoberta dos membros da superfamília de TNF- α	3
Figura 2. Vias de transdução de sinal estimuladas por LPS em macrófagos	7
Figura 3. Vias de sinalização intracelulares ativadas por TNF- α	11
Figura 4. Via de sinalização de cAMP	13
Figura 5. Principais funções fisiológicas e patológicas determinadas por TNF- α	17
Figura 6. Possíveis efeitos da formação de ADAs sobre anticorpos monoclonais	25
Figura 7. Terapias anti-TNF- α atuais (incluindo biosimilares)	27
Figura 8. Custos de tratamento de pacientes com terapias anti-TNF- α atuais.	28
Figura 9. Exemplos de pequenas moléculas inibidoras da produção de TNF- α	31
Figura 10. Esquema do mecanismo de obtenção de derivados de imidazopiridinas por MCR	32
Figura 11. Diferentes estruturas possíveis para a síntese de derivados de imidazopiridinas	32
Figura 12. Exemplos de derivados de imidazopiridinas atualmente empregados como fármacos	33
Figura 13. Desenho experimental esquemático.....	39
Figura 14. Derivados de imidazopiridinas inibem a produção de TNF- α em células U-937	50
Figura 15. Derivados de imidazopiridinas inibem a produção de TNF- α em macrófagos peritoneais	51
Figura 16. Efeito dos derivados de imidazopiridina na viabilidade celular de células U-937	53
Figura 17. Efeito dos derivados de imidazopiridina na viabilidade celular de macrófagos peritoneais	54

Figura 18. Diferentes perfis de localização de NFκB são induzidos por derivados de imidazopiridinas em células U-937	56
Figura 19. A inibição da fosforilação de IκB-α e p38-MAPK é induzida pelo tratamento com o composto 4B em células U-937	57
Figura 20. A aplicação do composto 4J em células U-937 eleva os níveis de cAMP	58
Figura 21. O estímulo com LPS e o tratamento com os compostos 4B e 4J elevam os níveis de NO em células U-937	59
Figura 22. O tratamento de células U-937 com os derivados de imidazopiridinas 4B e 4J também interfere na produção de outras citocinas que não TNF-α	61
Figura 23. O tratamento com os compostos 4B e 4J tem efeito protetivo sobre o tratamento com dose letal de LPS, no modelo de sepse murino	62
Figura 24. Vias de sinalização alteradas pelo tratamento com derivados de imidazopiridinas	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. DL50, IC50 e índice terapêutico (IT) estabelecidos para os oito compostos testados	55
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ADA	Anticorpos anti-droga
ADL	Adalimumab
AMP	Adenosina monofosfato
AS	Espondilite anquilosante
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CD14	Agrupamento de diferenciação 14
CO ₂	Dióxido de carbono
CZP	Certolizumab pegol
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole, diidroclorida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
ETA	Etanercept
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Região do fragmento cristalizável
FADD	Domínio de morte associado a Fas
GOL	Golimumab
IBD	Doença inflamatória intestinal
IFX	Infliximab

IgG	Imunoglobulina G
IκB	inibidor de NFκB
IKK	IκB quinase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMP	Imidazopiridina
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCR	Reação multicomponente
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
Ñ.E.	Não estimulado
NFκB	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
p38	Proteína quinase p38 ativada por mitógenos
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PBS	Tampão fosfato salino
PDE	Fosfodiesterase
PE	R-ficoeritrina
PEG	Propilenoglicol
PKA	Proteína quinase A
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato

PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RA	Artrite reumatoide
rhaPC	Proteína C humana ativada recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
TACE	Enzima de conversão de TNF- α
TLRs	Receptores do tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TRADD	Domínio de morte associado a TNFR1

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico do TNF-alfa	1
1.2. Estrutura, síntese e receptores de TNF- α	3
1.3. Regulação da expressão de TNF- α	4
1.4. Transdução de sinal e mecanismos efetores	8
1.5. O papel do AMP cíclico e do óxido nítrico na produção de TNF- α	12
1.6. Função fisiológica, homeostática e patogênica de TNF- α	15
1.7. Sepses.....	17
1.8. TNF- α na sepses	20
1.9. Terapias anti-TNF- α na sepses	22
1.10. Terapias anti-TNF- α : história, efeitos e estado atual	24
1.11. Pequenas moléculas como alternativas para inibição de TNF- α	29
1.12. Prospecção de imidazopiridinas e seus derivados.....	31
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Fluxograma	39
4.2. Reagentes e equipamentos	39

4.3. Derivados de imidazopiridinas	41
4.4. Cultura de células	41
4.5 Tratamentos	41
4.6. Avaliação da diferenciação de monócitos	42
4.7. Análise da viabilidade celular	42
4.8. Avaliação da produção de TNF- α	43
4.9. Avaliação da translocação de NFkB por imunofluorescência	44
4.10. Quantificação de proteínas intracelulares por citometria de fluxo	44
4.11. Avaliação da produção de óxido nítrico de sobrenadante celular	45
4.12. Quantificação dos níveis de cAMP	45
4.13. Análise múltipla de citocinas por multiplex	46
4.14. Avaliação do efeito protetivo de imidazopiridinas <i>in vivo</i>	47
4.15. Análise estatística	48
5. RESULTADOS	50
5.1. Dos onze compostos sintetizados, oito são solúveis	50
5.2. O tratamento com derivados de imidazopiridinas apresenta atividade inibitória da produção de TNF- α de maneira em células de linhagem celular U-937 e macrófagos peritoneais	50
5.3. O tratamento com derivados de imidazopiridinas induz citotoxicidade em células de linhagem celular U-937 e macrófagos peritoneais	52
5.4. Os derivados 4B e 4J apresentam os melhores índices terapêuticos em células U-937	54
5.5. O tratamento com o derivado de imidazopiridina 4B impede a translocação de NFkB para o núcleo de células U-937	55
5.6. O impedimento da translocação de NFkB para o núcleo de células U-937 é mediado pela inibição da fosforilação de I κ B- α e p38 MAPK	56
5.7. O tratamento com o composto 4J eleva os níveis de cAMP em células U-937, contrapondo a ativação com LPS	58

5.8. O tratamento com os compostos 4B e 4J alteram os níveis de NO em células U-937	59
5.9. O tratamento com os compostos 4B e 4J modula a produção de outras citocinas que não TNF- α	60
5.10. O tratamento de camundongos C57BL/6 com os compostos 4B e 4J possui efeito protetivo no modelo <i>in vivo</i> de sepse	60
6. DISCUSSÃO	64
6.1. A ação inibitória de derivados de imidazopiridina na produção de TNF- α	64
6.2. A regulação da via clássica de NF κ B pelo composto 4B	68
6.3. A regulação de cAMP e NO pelo composto 4J	70
6.4. 4B e 4J como inibidores de TNF- α e seus possíveis mecanismos	74
6.5. Espectro de ação e efeitos <i>in vivo</i> do tratamento com 4B e 4J.....	76
7. CONCLUSÕES	85
8. PERSPECTIVAS.....	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico do TNF-alfa

TNF-alfa (TNF- α) é uma citocina, ou seja, faz parte de um grupo de glicoproteínas ou polipeptídeos que atuam como mensageiros intercelulares e que tem função em diversos processos fisiológicos, como defesa, crescimento tecidual, reparo e controle de neoplasias (ANDREAKOS et al., 2002). Durante os anos 80 e 90, diversos estudos demonstraram que além de células do sistema imunológico (monócitos, macrófagos, células T e afins), células não tipicamente consideradas imunócitos (células endoteliais e fibroblastos) também são capazes de produzir e secretar um grande espectro de citocinas durante o curso da resposta imune (TSAI et al., 1996; ANDREAKOS et al., 2002; FALVO, 2010). Citocinas são capazes de regular sua própria expressão, ou de outras citocinas, agindo de forma autócrina ou parácrina (FELDMANN, 2001), propriedade importante na comunicação e progressão da resposta imune (STEVENS, 2006). Um mecanismo que exemplifica tal processo é a produção concomitante de citocinas pró-inflamatórias, potencializadoras do processo inflamatórios, e anti-inflamatórias, que funcionam de maneira a limitar a duração e extensão da inflamação, mantendo, em essência, a homeostase do organismo (AREND, 1995; FELDMANN, 2001).

Embora a causa de diversas doenças inflamatórias não seja totalmente elucidada, a grande maioria é caracterizada por uma desregulação na rede de citocinas, frequentemente pela superprodução e liberação de citocinas inflamatórias, perturbando o equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios (ASADULLAH, 2002; FELDMANN, 2002). No topo da rede de citocinas, encontra-se o fator de necrose tumoral (TNF- α), que age como primeiro sinal da resposta inflamatória, induzindo, a partir daí, a produção de outras citocinas (BORISH, 2003; VAN DER BERG, 2001). Desde sua clonagem nos anos 80, TNF- α tem sido extensivamente estudado devido à suas propriedades bioquímicas e biológicas (PENNICA et al., 1985; HARANAKA et al., 1986; AGGARWAL et al., 1987).

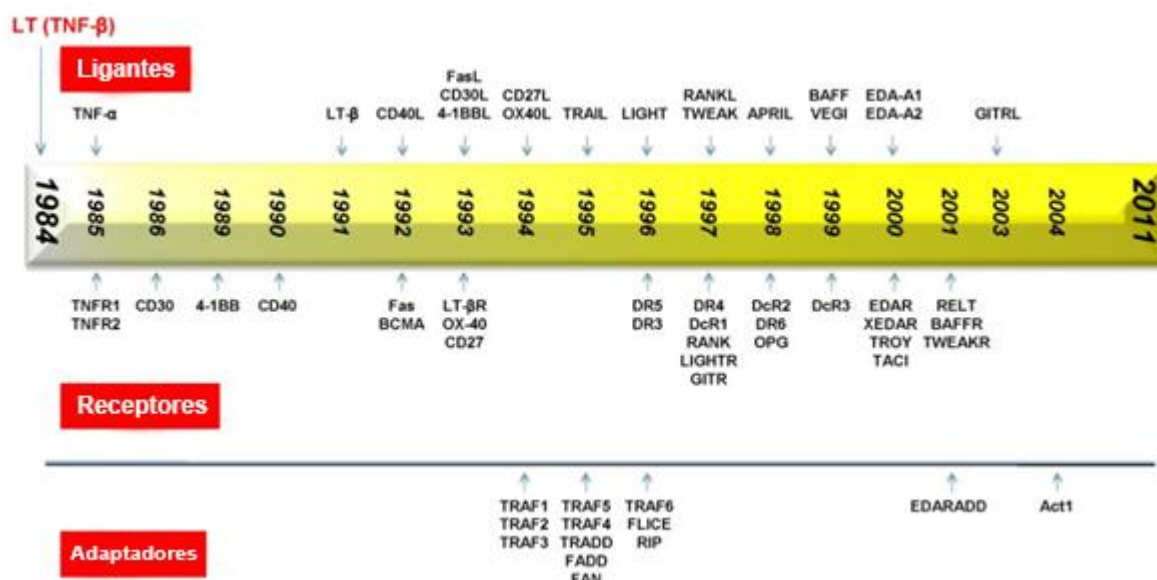
O primeiro uso do termo, ainda como “fator necrosante de tumores”, foi em 1962, a partir da sua atividade indutora de regressão de tumores induzida pelo soro

de camundongos expostos a lipopolissacarídeos de *Serratia marcescens* (O'MALLEY, 1962). Inicialmente o desafio era entender como constituintes do soro de animais que haviam feito contato com bactérias possuíam atividade antitumoral quando administrados *in vivo*. O soro de animais estimulados devia, então, conter um agente antitumoral previamente não descrito, que foi chamado de fator de necrose tumoral (TNF) (SHEAR, 1944).

Em 1985, duas estruturas diferentes de TNF foram identificadas e tiveram seus genes clonados. A primeira proteína purificada, de 25 kDa, foi denominada Linfotóxina- α (LT- α), posteriormente renomeada como TNF- β depois da descoberta da homologia de sequência com TNF- α (AGGARWAL, 1984; AGGARWAL, 1985). A identificação de uma proteína de 17 kDa nos mesmos ensaios de purificação foi utilizada para determinar o termo final TNF- α . O sequenciamento das bandas proteicas detectou homologia de 50% entre elas (AGGARWAL et al., 1985), e a produção de anticorpos imunologicamente distintos para cada uma definiu TNF- α como a proteína produzida por macrófagos e TNF- β como a produzida por linfócitos (KELKER et al., 1985; BRINGMAN, 1987). Trinta e dois anos depois, 19 membros distintos da superfamília de TNF- α foram identificados (Figura 1). Estes se ligam a um total de 29 receptores diferentes. De maneira geral, ambos os ligantes e receptores são expressos em células do sistema imunológico, porém outros tipos celulares expressam ligantes e receptores tanto em estado fisiológico quanto patológico (AGGARWAL, 2012).

Apesar do nome fator de necrose tumoral, o papel real de TNF- α se relaciona mais à orquestração da resposta inflamatória do que com a vigilância imune de neoplasias (STEVENS, 2006). A intensa atividade pró-inflamatória impede a administração sistêmica de TNF- α em pacientes com câncer (BALKWILL, 2006; MOORE et al., 1999) A utilização de TNF- α como antitumoral é muito específica para casos de sarcoma e melanomas, nas quais demonstrou boa eficiência com perfil de segurança aceitável (DEROOSE et al., 2011, DEROOSE et al., 2012, GRUNHAGEN et al., 2009). Dessa maneira, não é surpresa que TNF- α recombinante tenha demonstrado toxicidade severa em testes clínicos, já que sua administração provavelmente hiperativa o sistema imune de maneira similar, por exemplo, à sepse. O interesse clínico em TNF- α então se volta para doenças inflamatórias e autoimunes (AGGARWAL, 2012), com grande potencial terapêutico. Assim, torna-se claro que a

produção elevada de TNF- α é indutora da inflamação crônica e que sua inibição pode ser útil terapêuticamente. Tal linha de pensamento é suportada por estudos nos quais altos níveis de TNF- α foram encontrados no tecido ou plasma de pacientes com diversas infecções, doenças inflamatórias e doenças associadas ao sistema imune



(TRACEY et al., 1987; FOLKS et al., 1989).

Figura 1. Linha do tempo da descoberta dos membros da superfamília de TNF- α . A jornada de identificação dos diferentes membros da família de TNF- α levou 20 anos. Adaptado de AGGARWAL, 2011.

1.2. Estrutura, síntese e receptores de TNF- α

O TNF- α humano é traduzido como uma proteína de 26 kDa. TNF- α recém-sintetizado é expresso na membrana plasmática e então clivado no domínio extracelular pela ação de uma metaloproteinase de matriz para liberar a forma solúvel de 17 kDa (PALLADINO et al., 2003). Em ambas as formas – associado à célula (membranar) ou secretado – a trimerização é requerida para a atividade biológica. Tanto a forma membranar quanto a secretada são biologicamente ativas, e a forma membranar é responsável pelo contato secundário célula-célula, ou sinalização justácrina: a interação de proteínas ligadas à membrana (que geralmente são secretadas) com receptores da célula adjacente (KRIEGLER et al., 1988). As funções específicas das duas formas permanecem controversas, embora esteja claro que têm funções biológicas sobrepostas e também distintas. Por exemplo, camundongos

transgênicos expressando apenas TNF- α membranar podem desenvolver doenças crônicas inflamatórias como artrite reumatoide (RA) (ALEXOPOLOU, 1997). De fato, o desenvolvimento e progressão de RA em modelos de roedores parece ser dependente tanto da forma membranar quanto solúvel de TNF- α (KUSTERS et al., 1997). Em contraste, estes mesmos camundongos são resistentes à toxicidade induzida por endotoxinas, indicando que as propriedades geradoras da sepse e choque séptico de TNF- α são devidas primariamente à produção da forma solúvel (JOSEPHS et al., 2000).

A enzima responsável pelo processamento do TNF- α membranar é chamada de enzima de conversão de TNF- α (TACE) (KRIEGLER, 1988; BLACK et al., 1995; MOSS et al., 1997). TACE faz parte de um grupo de enzimas crucial para o processamento de diversas proteínas associadas à membrana, incluindo TNF- α , ligante de Fas e receptores de fatores de crescimento endotelial. Receptores de TNF (TNFRs) também podem ser clivados por TACE, produzindo receptores solúveis que funcionam como moduladores da atividade de TNF- α (SECKINGER, 1988; OLsoon et al., 1989). TACE parece também ter um número de funções biológicas cruciais em adição ao processamento de TNF- α . A deficiência de TACE em camundongos é letal para o desenvolvimento fetal (PESCHON et al., 1998), enquanto camundongos deficientes em TNF- α ou TNFRs sobrevivem à gestação.

1.3. Regulação da expressão de TNF- α

TNF- α tem papel importante na resposta imune inata e adaptativa e no funcionamento normal de linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (GRIVENNIKOV et al., 2006). Embora TNF- α tenha sido inicialmente descrito como produto de macrófagos (BEUTLER, 1986), outros estudos demonstraram que o gene de TNF- α é de fato expresso em uma grande variedade de células, incluindo células T, células B, células *natural killer* (NK), mastócitos, células dendríticas e fibroblastos (SUNG et al., 1988; GOLDFELD, 1989; GORDON, 1990; CAUX et al., 1994).

No nível transcricional, o gene de TNF- α é ativado em resposta à uma diversidade de estímulos específicos característicos da ativação celular, inflamação,

infecção e estresse. Entre estes estímulos estão a sinalização de cálcio, patógenos, mitógenos, estresse químico e osmótico e radiação. Indutores da transcrição de TNF- α também incluem ligantes para diversas classes de receptores, incluindo receptores de antígenos, receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e receptores de citocinas (AKIRA, 2004). A transcrição de TNF- α após a exposição a certos estímulos é paradigmática de um gene de resposta imediata. Por exemplo, durante a exposição de monócitos à lipopolissacarídeos (LPS), PRRs induzem a produção do RNA mensageiro (mRNA) de TNF- α , que é transcrito em minutos e independe da síntese proteica *de novo* (GOLDFELD, 1991; GOLDFELD et al., 1992).

PRRs possibilitam ao organismo o reconhecimento e resposta à sinais de perigo endógenos e exógenos. A interação de ligantes com PRRs inicia diferentes vias de sinalização que por fim ativam elementos transcrpcionais, como NF κ B (MOGENSEN, 2009). Receptores do tipo *toll* (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) são as duas famílias mais importantes de PRRs. Tais receptores respondem a componentes microbianos diferentes, bem como à sinais de perigo endógenos, e desencadeiam a resposta inflamatória por várias vias de sinalização (CASTELLHEIM, 2009).

TLRs representam uma das vias que regulam a expressão de um grande número de mediadores inflamatórios. São compostos de proteínas transmembrana e incluem 13 membros em mamíferos (10 em humanos) (KAWASAKI, 2014). Alguns TLRs são expressos na membrana celular, enquanto outros são intracelulares (BLASIUS, 2010). TLRs compartilham similaridades estruturais, mas se diferenciam um do outro pela especificidade de seus ligantes, pelos padrões de expressão e pelas vias de sinalização ativadas. TLR4, por exemplo, está envolvido na sinalização de perigo tanto endógeno quanto exógeno e está intimamente envolvido com a sepsis (CAVAILLON, 2005).

A sinalização por TLR envolve diferentes proteínas adaptadoras, como fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteína adaptadora semelhante a MyD88 (MAL), domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN- β (TRIF) e molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM), que são acopladas a proteínas quinases. Por fim, a sinalização por TLR leva à ativação de fatores de transcrição como NF κ B, proteína ativadora-1 (AP-1) e membros da família reguladora de interferon (IRF) (O'NEILL,

2007). A sinalização por TLRs é complexa e envolve o uso seletivo de diferentes combinações de proteínas adaptadoras, variando entre os tipos de TLR. TLRs se ligam e reconhecem seletivamente diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MOGENSEN, 2009). De maneira geral, TLR2 reconhece ácido lipoteicoico, lipoproteínas e peptideoglicanos, ao passo que TLR4 reconhece LPS. O reconhecimento de LPS começa com a proteína de ligação ao LPS entregando LPS para CD14 solúvel ou ligado à membrana. CD14 então transfere LPS para outro correceptor até induzir a formação do dímero de TLR4, que inicia a sinalização (CASTELLHEIM, 2009).

TLRs recrutam proteínas adaptadoras para a superfície da célula (como MyD88), que então ativam uma série de quinases citoplasmáticas (KISHORE, 2004). Fatores de transcrição ativados pelas vias de TLR incluem NFκB, AP-1 e IRF-3. A ligação de PAMPs à TLRs rapidamente induz a expressão de uma ampla gama de genes. Estes genes preparam a célula para uma destas respostas principais: iniciar o processo inflamatório, ou extinguir a reação inflamatória se nenhum outro perigo for detectado (RUSSEL, 2011).

A transdução de sinais extracelulares em respostas intracelulares envolve um extenso grupo de vias de sinalização intracelular. Proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) são uma família importante de quinases envolvida na transdução de sinais inflamatórios, resultando na ativação de diversas proteínas nucleares e fatores de transcrição (CASTELLHEIM, 2009). As vias de MAPK são ativadas por fosforilações sequenciais e incluem ERK, p38 e JNK. Algumas MAPKs são expressas universalmente, enquanto outras são tecido-específicas. As vias de MAPK são complexas e interconectadas e podem cooperar com outras vias de sinalização induzidas por ligantes (ROUX, 2004). A ativação de MAPK pode levar a respostas diferentes e opostas em diferentes tecidos. Quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK), proteína quinase p38 ativada por mitógenos (p38 MAPK) e quinase c-Jun N-terminal (JNK) podem ser ativadas por várias substâncias endógenas e exógenas devido as várias quinases atuando nessa cascata (CUSCHIERI, 2005). O resultado final da ativação destas quinases é a ativação de NFκB – junto de outros

fatores de transcrição – e transcrição do gene de TNF- α (SCHULZE-OSTHOFF, 1997; TAK, 2001) (Figura 2).

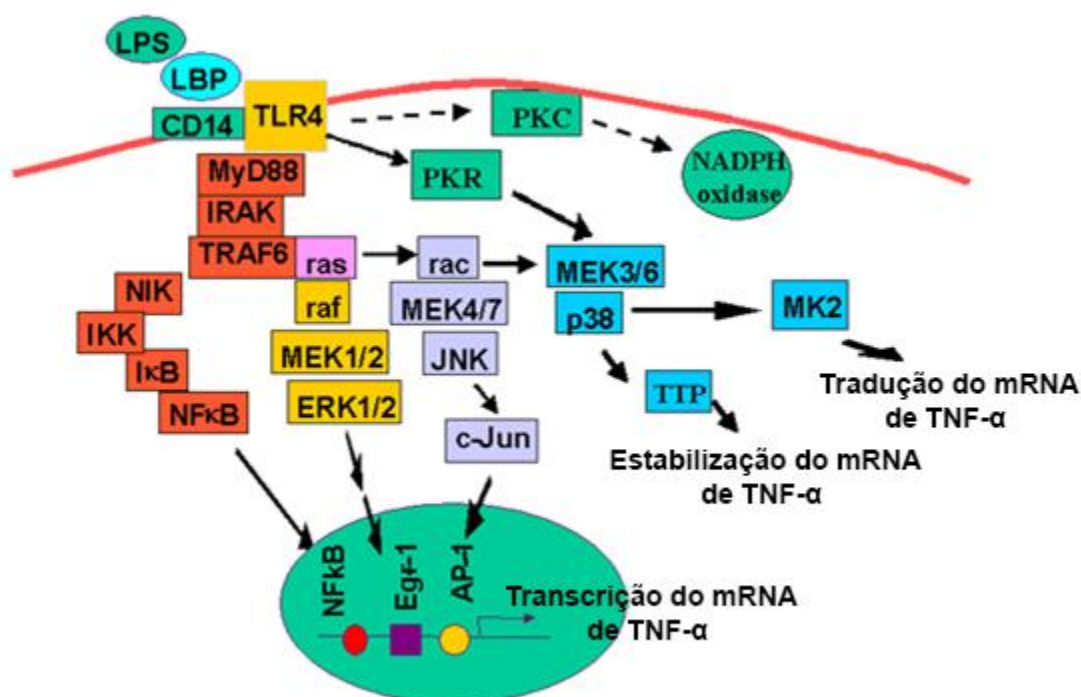


Figura 2. Vias de transdução de sinal estimuladas por LPS em macrófagos. A ligação de LPS ao receptor TLR4 promove a transdução de sinal por diferentes vias envolvidas na transcrição e estabilidade do mRNA de TNF- α , bem como na tradução do mesmo. Adaptado de KISHORE, 2004.

A ativação de NFκB, evidenciada pela translocação de complexos citoplasmáticos, tem papel central na inflamação por sua habilidade de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios (BALDWIN, 1996). Tal via é ativada pela estimulação celular, geralmente por sinais relacionados à patógenos ou estresse (TAK, 2001). Em adição ao seu papel na imunidade inata, a sinalização por NFκB controla uma grande variedade de processos celulares, incluindo proliferação celular (GUTTRIDGE, 1999; LA-ROSA, 1994) e apoptose (PERKINS, 1997).

A família do NFκB faz parte de um grupo de fatores de transcrição pleiotrópicos que desempenham um papel crítico na iniciação das respostas imunes inata e adaptativa (CASTELLHEIM, 2009). Eles são ativados por inúmeros estímulos e contribuem para a transcrição de mais de 200 genes envolvidos na inflamação, apoptose, proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento de órgãos e tumorigênese (HOESEL, 2013; BRADLEY, 2008). NFκB está envolvido na ativação transcricional de vários genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas (como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8), quimiocinas, moléculas de adesão, imunoenzimas e controla a

expressão de moléculas de adesão, que levam ao recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (HOESEL, 2013; LAWRENCE, 2009).

NFkB existe na forma inativa no citoplasma, fisicamente associado a uma proteína inibitória chamada inibidor de NFkB (IκB). A partir do estímulo inflamatório, IκB é fosforilada e degradada, liberando dímeros de NFkB que são translocados para o núcleo (NAPETSCHNIG, 2013). A fosforilação de IκB é realizada por um complexo de quinases chamados IκB quinase (IKK) (TAK, 2001). NFkB se liga a promotores/ativadores dos genes alvo no núcleo, levando ao aumento da transcrição e expressão dos mesmos (DONG, 2007). A transcrição do mRNA de TNF-α é induzida e controlada pelo NFkB, consistente com a presença de sítios de ligação a este fator de transcrição na região promotora do gene de TNF-α (TUOHY, 1998; CAREY, 1998; MERIKA, 2001). A inibição da atividade de NFkB por IκB-α e IκB quinase está relacionada à inibição da transcrição de TNF-α induzida por LPS em monócitos, células dendríticas e macrófagos (SHAKHOV, 1990; FOXWELL, 1998; LIM, 2007).

1.4. Transdução de sinal e mecanismos efetores

Os mecanismos pelos quais os vários membros da superfamília de TNF induzem a transdução de sinais têm sido extensivamente estudados. O simples fato de existirem 19 ligantes para 29 receptores implica que ao menos um dos ligantes interage com mais de um receptor (AGGARWAL, 2012).

As respostas biológicas ao TNF-α são mediadas por dois receptores estruturalmente distintos: o receptor tipo 1 (TNFR1, p60, p55 ou CD120a) e tipo 2 (TNFR2, p80, p75 ou CD120b) (AGGARWAL et al., 1985; TARTAGLIA et al., 1991). Ambos os receptores são glicoproteínas transmembrana com múltiplas repetições ricas em cisteína no domínio N-terminal extracelular. Embora seus domínios extracelulares compartilhem homologia estrutural e funcional, seus domínios intracelulares são distintos e transduzem seus sinais por vias sobrepostas e distintas. A primeira característica a distinguir os domínios intracelulares de TNFR1 e TNFR2 é a presença de um domínio de morte em TNFR1, ausente em TNFR2 (AGGARWAL et al., 2012). O domínio de morte é uma sequência de aproximadamente 70 aminoácidos fundamental para a capacidade de TNF-α de induzir a apoptose celular (HSU et al.,

1996). Assim como o domínio de morte do ligante de Fas, ele provê um sitio de ancoragem para um número de proteínas acessórias, incluindo a proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD), a proteína de domínio de morte associada a TNFR1 (TRADD) e o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF-2). TRADD e TRAF-2 provêm os pontos de ramificação para as proteínas pró-apoptóticas e vias de sinalização inflamatórias características de TNFR1 (ROTHER et al., 1984; ROTHER et al., 1985). Apesar do potencial indutor de apoptose de TNF- α , tal processo geralmente não se dá caso não haja alguma perturbação celular, como inibição do ciclo celular, deficiência na síntese proteica, ou metabolismo celular alterado (DARZYNKIEWICZ et al., 1984; AUSTGULEN et al., 1986).

Em condições fisiológicas, a sinalização por TNFR1 é responsável pelas propriedades pró-inflamatórias e produtoras de choque de TNF- α . Camundongos deficientes em TNFR1 são resistentes à letalidade induzida por endotoxinas, enquanto camundongos deficientes em TNFR2 permanecem sensíveis (JOSEPHS et al., 2000; EVANS, et al., 1994). De maneira diferente, outras respostas biológicas ao TNF- α são dependentes da sinalização por ambos receptores. Dano hepático e desenvolvimento de RA secundária, por exemplo, são reduzidos na ausência de TNFR1 ou TNFR2 (ALEXOPOULOU et al., 1997; JOSEPHS et al., 2000).

Todas células nucleadas expressam receptores de TNF, embora sua distribuição varie de acordo com o tipo celular. TNFR1 é expresso constitutivamente na maioria dos tipos celulares, ao passo que a expressão de TNFR2 pode ser induzida, mas não é canônica. Além disso, TNFR2 é restrito à certos tipos celulares e capaz de discriminar TNF- α de espécies diferentes. Os receptores também se distinguem em suas afinidades de ligação ao TNF- α homotrimérico. Embora ambos possam ser considerados de alta afinidade, a cinética de ambos difere drasticamente. A ligação de TNF- α homotrimérico a TNFR1 é essencialmente irreversível, enquanto TNFR2 está associado a uma cinética de ligação e liberação (GRELL et al., 1998).

Ambos receptores podem ser clivados da superfície celular por membros da família de metaloproteinases de matriz em resposta à sinais inflamatórios, como ativação de TNFRs e TLRs. Os domínios extracelulares clivados mantêm sua habilidade de ligação ao TNF- α e, assim, funcionam tanto como inibidores endógenos

quanto como facilitadores da atividade biológica de TNF- α (VAN ZEE et al., 1992), dependendo de suas concentrações e das concentrações dos ligantes.

Na maioria das células, contudo, a ativação de TNFRs não desencadeia o processo apoptótico, mas sim leva à ativação do fator nuclear kappa B (NFkB), geralmente pela fosforilação e subsequente degradação de I κ B quinase (IKK), permitindo que o NFkB seja translocado para o interior do núcleo, onde se liga ao DNA e funciona como ativador transcricional. Em células da micróglia, por exemplo, a expressão de TNF- α e seus receptores regula a sobrevivência destas células por meio de NFkB. No cérebro, TNF- α já foi descrito como indutor de sinais pró-inflamatórios importantes na depressão, desordem bipolar, epilepsia, Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (DOWLATI et al., 2010; BRIETZKE, 2008; MURASHIMA, 2008; SWARDFAGER et al., 2010; NAGATSUA, 2005; SAYED et al., 2010). Em adição, NFkB pode induzir a produção de TNF- α , amplificando sua via de sinalização e também de TNFRs (SHIKAMA, 2004; ZUCERKMAN, 1991). Tal via, junto da ativação adjacente de outros fatores/proteínas, explicam a habilidade do TNF- α de induzir a resposta inflamatória e controlar a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (KOHAZE et al., 1986).

A ativação de fatores de transcrição globais pelo TNF- α , como NFkB, explica seus efeitos nos diversos tipos celulares de virtualmente todos os sistemas fisiológicos humanos. Tal efeito explica também sua capacidade pró-inflamatória, especialmente em células do sistema imunológico, pela indução da cascata de sinalização que leva a produção de citocinas e quimiocinas. TNF- α promove a diferenciação de monócitos e macrófagos (TAKEDA et al., 1987; TRINCHIERI et al., 1986), ativa a proliferação de células B (HIGUCHI et al., 1997), aumenta a expressão de TNFRs (JELINEK, 1987; KEHRL, 1987), promove a proliferação de fibroblastos (VILCEK et al., 1986; PALOMBELLA, 1988) e é um poderoso indutor de inflamação, agindo em conjunto com outras citocinas, como interleucina 1 beta (IL-1 β) (DINARELLO et al., 1986), IL-6 (SHALABY et al., 1989; ZHANG et al., 1988) e o próprio TNF- α (PHILIP, 1986).

Todos os membros da família, sem exceção, possuem atividade pró-inflamatória, majoritariamente pela ativação de NFkB (BHARDWAJ, 2003; GAUR, 2003). A maioria destes tem papéis tanto benéficos quanto danosos, de tal maneira que embora TNF- α esteja ligado a proliferação fisiológica e diferenciação de células

B em condições favoráveis, sua atividade está relacionada com diversas patologias como câncer, desordens cardiovasculares, neurológicas, pulmonares, autoimunes e metabólicas (AGGARWAL, 2003). Na célula, TNF- α induz ao menos cinco tipos diferentes de sinais, incluindo a ativação de NF κ B, a via de apoptose, ERK, p38 MAPK e JNK (MORGAN, 2010; YUASA et al., 1998) (Figura 3).

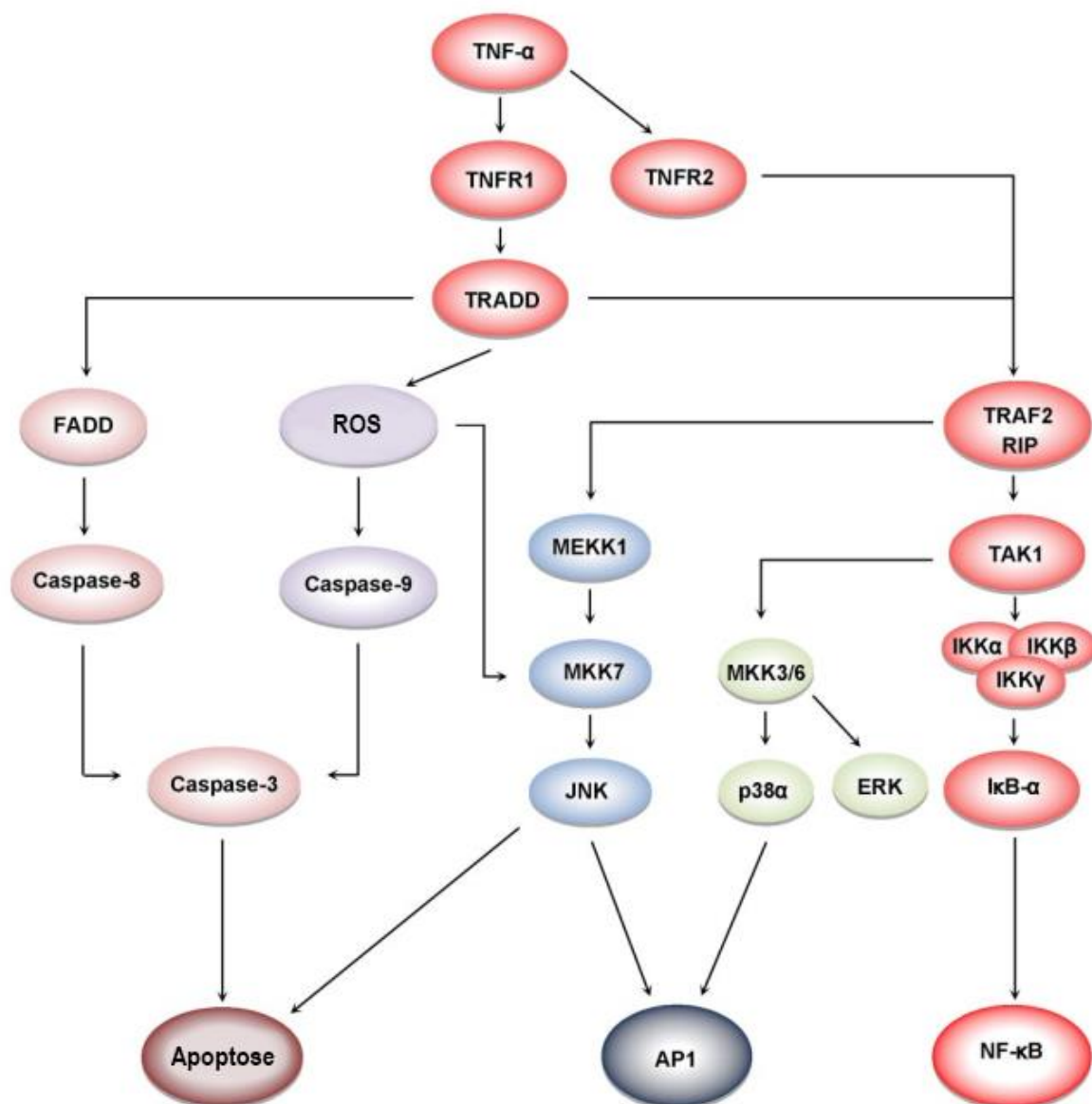


Figura 3. Vias de sinalização intracelulares ativadas por TNF- α . A ligação de TNF- α a seus receptores desencadeia diferentes vias de sinalização intracelular, com diversas proteínas adaptadoras e funções celulares também distintas. Adaptado de AGGARWAL, 2011.

Embora membros da superfamília de TNF tenham a capacidade de ativar NF κ B, a maioria – diferente de TNF- α - o faz de maneira específica para cada tipo celular. A habilidade de TNF- α de ativar NF κ B de maneira não seletiva o torna o

membro pró-inflamatório mais promíscuo e universal na maioria das situações (AGGARWAL, 2012).

1.5. O papel do AMP cíclico e do óxido nítrico na produção de TNF- α

Os mecanismos regulatórios da produção de TNF- α não dependem apenas da via de NF κ B. De forma também ativa, altos níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e alta atividade de adenilato ciclase (enzima responsável pela conversão de adenosina trifosfato em cAMP) levam à inibição da produção de TNF- α tanto ao nível transcricional quanto pós-transcricional (PALLADINO, 2003). Agentes que elevem os níveis de cAMP intracelular conhecidamente diminuem a produção de TNF- α por células mononucleares (KAMBAYASHI, 1995; EIGLER, 1998).

Adenosina e seu derivado natural, 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) são fatores importantes na sinalização intracelular. A via de adenosina/cAMP influencia vários processos bioquímicos implicados no controle da inflamação (MOORE, 1995), bem como na patogênese de diversas doenças, como isquemia do miocárdio, falência renal, epilepsia, Alzheimer e Parkinson (STONE, 1995). Os efeitos de cAMP e adenosina na produção de citocinas têm sido amplamente demonstrados (HEINE et al., 1995). De maneira geral, atuam como inibidores da produção de citocinas pró-inflamatórias e indutores da produção de citocinas anti-inflamatórias. (LE-PAGE et al., 1998; REINSTEIN et al., 1994). A produção de citocinas inflamatórias dependentes de TLRs e NF κ B, como TNF- α e proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α) é substancialmente suprimida pela produção de cAMP, ao passo que a produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias é aumentada (OLLIVIER, 1996). Além disso, a síntese de TNF- α pode ser atenuada em células do sistema imunológico expostas a inibidores de fosfodiesterase (PDE) após desafio com diversos estímulos pró-inflamatórios (STRIETER, 1988).

Classicamente, foi demonstrado que a inibição de PDE resulta na acumulação do segundo mensageiro cAMP e subsequente ativação de PKA (ENDRES, 1991; WALL et al., 2009). A ativação de PKA então leva à fosforilação do fator de transcrição da proteína de ligação ao elemento responsivo de cAMP (CREB), transmissão de sinais ao núcleo e subsequente modulação da transcrição gênica (KOPPERUD, 2003)

(Figura 4). Essa cascata linear aparentemente simples não explica completamente o mecanismo pelo qual a elevação de cAMP intracelular exerce sua ampla gama de efeitos nas funções celulares (BRYN, 2006). Evidências crescentes sugerem que cAMP pode funcionar através de mecanismos tanto dependentes quanto independentes de PKA (CULLEN, 2004; SPRINGETT, 2004).

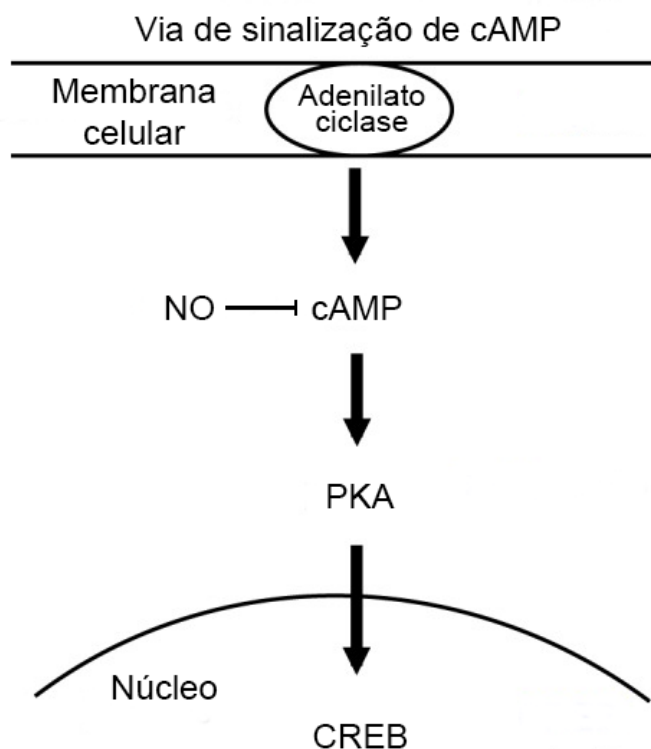


Figura 4. Via de sinalização de cAMP. A regulação da síntese de TNF- α é controlada por diversos fatores, como a via de cAMP/PKA/CREB, que leva à inibição da atividade de NF κ B. Adaptado de IKUTA, 2013.

Em um outro ponto de análise sabe-se que óxido nítrico (NO) pode regular os níveis de produção de cAMP (WANG, 1997). A síntese de NO é geneticamente controlada por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (FÖRSTERMANN et al., 1995). A geração de NO é feita pela isoforma induzível (iNOS), presente em vários tipos celulares, incluindo macrófagos. Via de regra, sua atividade é constitutiva, mas pode ser induzida pelo tratamento com LPS (ZIDEK, 2001).

Óxido nítrico é um radical livre gasoso produzido por diferentes tipos celulares com um repertório diverso de funções importantes classicamente descritas, como neurotransmissor, vasodilatador e modulador imune (GARTHWAITE, 1988; PALMER, 1988; SHIBUKI, 1991; MOILANEN, 1995; FÖRSTERMANN et al., 1995). A produção de NO tem sido reconhecida como marcador em uma variedade de doenças humanas

associadas com inflamação e imunoativação (KAUR, 1994; ZINETTI, et al., 1995). A maioria dos efeitos de NO é mediada por uma única via de sinalização de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), por sua vez regulada por guanilato ciclase (IGNARRO, 1990). O aumento de cGMP ativa proteínas quinases que fosforilam proteínas alvo envolvidas na regulação da função celular (STEWART, 1994; KUO, 1995). Embora o papel de cGMP como mensageiro secundário de NO seja irrevogável, algumas vias de transdução de sinal parecem independender de cGMP (ZHONG et al., 1995). NO é capaz de reagir com uma variedade de enzimas além da guanilato ciclase, como provado pela inabilidade de análogos de cGMP de reproduzir efeitos conhecidos de NO, como a própria síntese de TNF- α (VAN DERVORT et al., 1994; LANDER et al., 1993). A diminuição de cAMP, por exemplo, pode resultar de sua síntese reduzida por adenilato ciclase, ou pelo seu catabolismo aumento pela atividade de PDE (GILL, 1979). Recentemente, adenilato ciclase foi adicionada à lista de enzimas que podem ser modificadas por NO (DUHE, 1994) que, juntamente com as evidências de que NO diminui os níveis de cAMP mesmo na presença de um inibidor de PDE, suportam a hipótese de que a redução da produção de cAMP é devido a sua menor síntese, ao invés de maior catabolismo (STAMLER, 1994; LANDER et al., 1995).

Coletivamente, tais investigações sugerem que NO usa vias independentes de cGMP para algumas de suas funções celulares. O efeito de NO na adenilato ciclase sugere que altos níveis de NO favoreceriam a síntese de TNF- α em monócitos humanos pela redução das concentrações de cAMP, como evidenciado em células U937 diferenciadas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (TAIMI et al., 1993). O tratamento dessas células com doadores de NO reduz a produção de cAMP exatamente pela inativação de adenilato ciclase (DUHE et al., 1994). Além do mecanismo baseado na regulação dos níveis de cAMP, a possibilidade de outros mecanismos interferirem na produção de TNF- α não pode ser descartada. NO, por exemplo, pode induzir a ativação expressão de fatores de transcrição, como NF κ B (LANDER et al., 1993).

Sob condições de inflamação local ou sistêmica, a alta produção de NO estabelecida pelas células locais amplifica os parâmetros inflamatórios, como citocinas e quimiocinas derivadas de monócitos (MÜHL, 2000). Assim, maior atenção tem sido dada ao potencial clínico de cAMP (AGTERESCH et al., 1999) e NO (MONCADA, 1999). Modular a produção patológica de NO e sua ação por meios

farmacológicos pode prover uma terapia anti-inflamatória efetiva para uma variedade de doenças (MÜHL, 2000).

O controle fino da expressão de TNF- α é essencial para a homeostase celular e fisiologia normal em humanos, como evidenciado pela descoberta de que níveis desregulados de TNF- α estão associados à múltiplas doenças, incluindo asma, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, doença de Chron, psoríase, sepse e alguns tipos de câncer (SETHI, 2008). A desregulação da expressão de TNF- α também está ligada a susceptibilidade a doenças infecciosas, incluindo tuberculose e malária cerebral, quando pouco ou muito TNF- α é produzido, respectivamente (LOU, 2001; JACOBS et al., 2007). O entendimento das vias regulatórias básicas e identificação dos mediadores que levam à expressão de TNF- α pode prover alvos para o desenho e desenvolvimento de agentes clínicos e terapêuticos importantes.

1.6. Função fisiológica, homeostática e patogênica de TNF- α

Um dos papéis biológicos centrais de TNF- α é na defesa do hospedeiro a infecções bacterianas, virais e parasitárias (SMITH et al., 1990). Fisiologicamente, TNF- α é importante na resposta normal à infecção, mas sua produção inapropriada ou excessiva pode ser danosa. TNF- α foi confirmado como o principal mediador do efeito letal de endotoxina de *Escherichia coli* pela demonstração de que a imunização passiva de camundongos com soro anti-TNF- α de coelhos protegeu camundongos da sua letalidade (BEUTLER, 1985). Babuíños passivamente imunizados com anticorpo monoclonal anti-TNF- α e subsequentemente injetados com dose letal de *E. coli* vivas foram protegidos de choque, disfunção de órgãos vitais, estresse e morte (TRACEY et al., 1987). A importância de TNF- α como um modulador da resposta do hospedeiro à infecção foi confirmada por estudos utilizando camundongos deficientes em TNFR1, os quais são resistentes a doses letais de lipopolissacarídeos de *Staphylococcus aureus*, mas são incapazes de eliminar a bactéria intracelular *Listeria monocytogenes*, sucumbindo à infecção (PFEFFER et al., 1993; ROTHE et al., 1993). TNF- α também tem se mostrado como essencial para a formação e manutenção de granulomas, limitando a disseminação de *Listeria* e outras infecções (ROACH et al., 2002). De fato, um grande número de infecções granulomatosas têm sido reportadas durante o uso de antagonistas de TNF- α para o tratamento de doenças inflamatórias (WALLIS et al.,

2005). A deleção do gene de TNF- α em camundongos revelou que TNF- α tem funções homeostáticas em adição ao seu papel imune e inflamatório na defesa contra patógenos, desenvolvimento de granulomas, resolução da inflamação e indução do reparo tecidual (MARINO et al., 1997). Diversos estudos descrevem funções para TNF- α na regeneração tecidual, como remielinização neuronal, remodelação cardíaca e regeneração de cartilagem (ARNETT et al., 2001; PARK et al., 2011; ZHAO et al., 2014; PAPATHANASIOU et al., 2015).

Para além do aspecto fisiológico e homeostático, o mesmo está relacionado com diversas funções patogênicas (AGGARWAL, 2003) (Figura 5). TNF- α induz inflamação, ativa o endotélio vascular, orquestra o recrutamento de células do sistema imunológico para o local de inflamação e promove a destruição tecidual (FELDMANN, 2009). A produção descontrolada de TNF- α foi ligada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias como artrite reumatoide, doença inflamatória do intestino, psoríase, espondilite anquilosante, artrite idiopática juvenil e sepse. Em contraste ao papel bem definido do TNF- α nestas doenças, seu papel na patogênese da esclerose múltipla é um enigma (PROBERT, 2015). Embora estudos iniciais sugiram que uma função patogênica para TNF- α na esclerose múltipla, testes clínicos utilizando inibidores de TNF- α foram descontinuados devido ao agravamento inesperado da doença (LENERCEPT MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP, 1999). Além disso, pacientes recebendo inibidores de TNF- α para outras doenças esporadicamente desenvolveram lesões com desmielinização (ROBINSON, 2001). Estas observações sugerem que TNF- α pode suprimir processos autoimunes e/ou exercer funções homeostáticas inclusive no microambiente do sistema nervoso. Diversos estudos sugerem que as atividades homeostáticas e patogênicas de TNF- α são mediadas por vias celulares e moleculares distintas. TNFR2 - expresso em células T regulatórias, oligodendrócitos e astrócitos - medeia a imunorregulação, sobrevivência neuronal e remielinização. TNFR1, por outro lado, induz inflamação do sistema nervoso central e desmielinização neuronal (PROBERT, 2015).

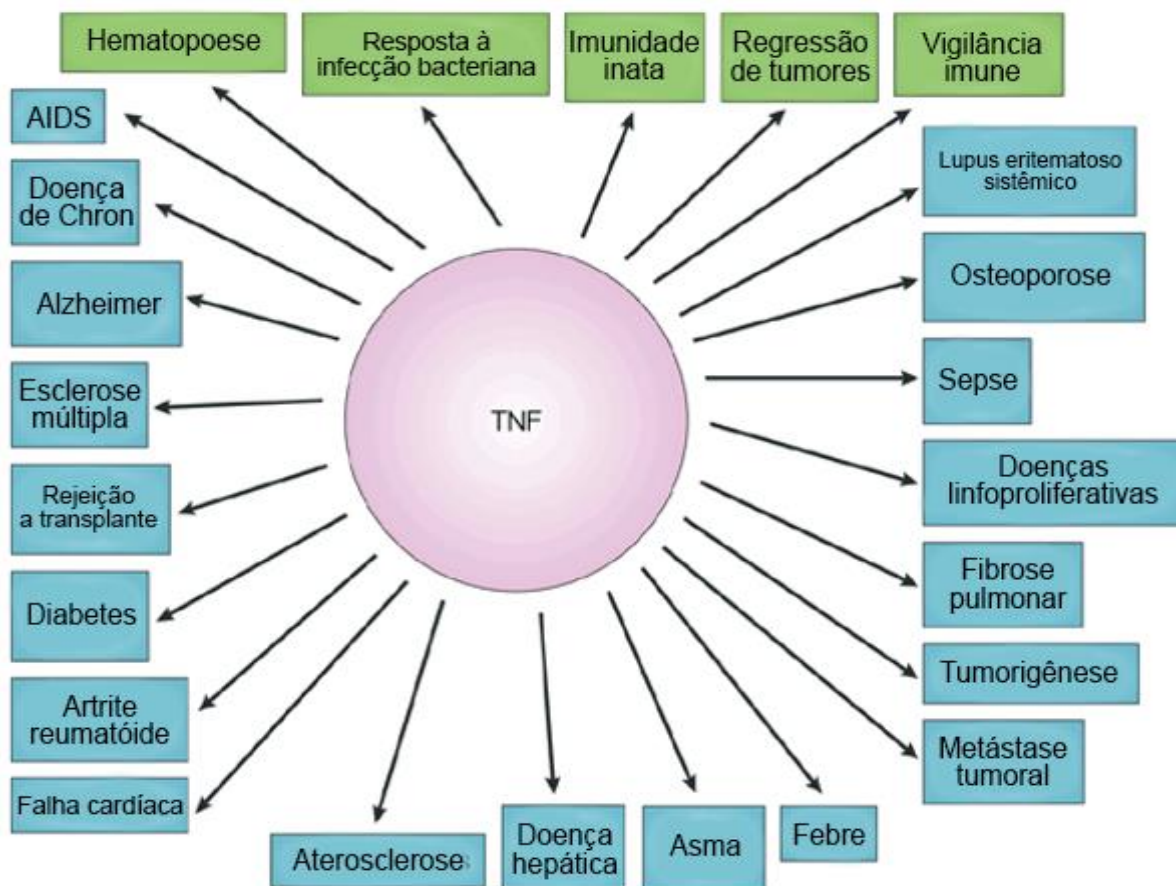


Figura 5. Principais funções fisiológicas e patológicas determinadas por TNF- α . Diferentes estudos indicam que embora TNF- α e sua superfamília sejam essenciais para funções fisiológicas (em verde), sua desregulação leva ao surgimento de diversas doenças (em azul). Adaptado de AGGARWAL, 2003.

1.7. Sepses

Ao mesmo tempo que TNF- α regula uma grande gama de funções celulares, seu potencial de estimular a resposta imune e inflamação no hospedeiro o implicam diretamente na patogênese da sepses.

A palavra sepses é derivada do grego *sêpsis*, que significa “decomposição” ou “putrefação”, e foi primeiramente mencionada por Homero, há aproximadamente 2700 anos atrás (GEROULANOS, 2006). Sepses, sepses severa e choque séptico são grandes problemas de saúde pública mundialmente, afetando milhões de pessoas a cada ano, e sua incidência aumenta anualmente (MARTIN et al., 2006). Apesar dos avanços no tratamento, choque séptico continua associado com altas taxas de mortalidade (DOMBROVSKIY et al., 2007). Estudos epidemiológicos reportam que

choque séptico é a causa mais comum de morte em unidades de tratamento intensivo e a décima maior causa de morte geral em países desenvolvidos (ANGUS et al., 2001). O estado séptico é particularmente desfavorável em idosos, imunocomprometidos e pacientes criticamente doentes (ANEL, 2005). Além de seu desafio clínico, o tratamento da sepse impõe um grande peso econômico nos sistemas de saúde mundiais (CHALUPKA, 2012). Com uma estimativa de 750.000 casos por ano apenas nos Estados Unidos da América (EUA), gera custos anuais estimados em aproximadamente 16,7 bilhões de dólares (BURCHARDI, 2004). Atualmente, sepse é uma das cinco condições que contribuem para os maiores gastos hospitalares nos EUA (CHALUPKA, 2012).

Apenas recentemente estudos têm levado a descrições detalhadas das características clínicas de pacientes sépticos e a um entendimento de sua patofisiologia. Tais achados tem levado a redefinições dos termos relacionados à sepse. Geralmente, sepse é vista como a resposta do hospedeiro a um patógeno invasor ou suas toxinas (DELLINGER et al., 2013). Em 1991, uma conferência de consenso desenvolveu uma única e universalmente aceita definição de sepse com o objetivo de facilitar o diagnóstico precoce, tratamento da doença e sua pesquisa. O resultado chave da conferencia foi o termo “síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), definido como uma combinação de sintomas clínicos sem a existência de uma infecção, podendo ser desencadeada por uma variedade de condições, infecciosas ou não, como trauma, queimaduras, hemorragia pancreatite e outras doenças (LEVY et al., 2003). Em contraste, o diagnóstico da sepse requer evidência clínica de infecção em conjunto de um estado de síndrome inflamatória. Sepse severa é caracterizada como a sepse complicada por disfunção de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão, podendo levar ao choque séptico, ao passo que choque séptico se refere ao estado de falha circulatória aguda, caracterizado por hipotensão arterial persistente (BONE et al., 1992). Muitos autores, porém, criticam os critérios de diagnóstico de SIRS por sua falta de especificidade e falta de valor de prognóstico, por serem critérios muito abrangentes e limitados em número. Em 2001, então, a definição de sepse foi revista com o objetivo avaliar as definições prévias de SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico (LEVY et al., 2003). A partir desta data, uma lista maior de critérios bioquímicos de diagnóstico foi desenvolvida, refletindo melhor o estado complexo desta doença. Em 2004, um comitê internacional de especialistas

em sepse publicou diretrizes práticas para o manejo da sepse severa e do choque séptico (DELLINGER et al., 2004). Tais diretrizes foram amplamente disseminadas como parte da “campanha de sobrevivência a sepse” e são regularmente atualizadas, com a última revisão tendo sido feita em 2013 (DELLINGER et al., 2013).

Nos últimos anos, uma grande quantidade de estudos foi publicada na tentativa de entender os complexos e dinâmicos mecanismos da patofisiologia que subjazem a heterogeneidade da sepse. Sepse se desenvolve quando a resposta inicial e apropriada do hospedeiro à infecção se torna amplificada e subsequentemente desregulada (COHEN, 2002), levando a um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatória. A resposta imune inata, diferente da resposta imune adaptativa, é capaz de imediatamente responder a patógenos invasores, desempenhando um papel importante na iniciação da patofisiologia da sepse (HANSEN, 2011). A ativação desta primeira linha de defesa celular resulta em uma liberação excessiva de citocinas, quimiocinas e outros reguladores inflamatórios (SCHULTE, 2013). Citocinas regulam uma variedade de respostas inflamatórias, incluindo a migração de células do sistema imunológico para o local de infecção, um passo crucial na contenção de uma infecção localizada e prevenindo-a de se tornar sistêmica (JANEWAY et al., 2001). Contudo, uma liberação de citocinas desregulada pode levar à disfunção endotelial, caracterizada por uma vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular. A síndrome resultante desta condição está clinicamente associada à hipotensão, hemoconcentração, extravasamento macromolecular e edema, sintomas frequentemente encontrados em pacientes sépticos (RIVERS et al., 2001). A disfunção destas barreiras epiteliais possibilita ao patógeno e seus produtos a invasão do organismo hospedeiro e sua dispersão, perturbando mecanismos regulatórios e, em última análise, causando disfunção de órgãos (DENK, 2012). Ademais, evidências indicam que as respostas imune e inflamatória estão intimamente conectadas a diferentes processos fisiológicos no hospedeiro humano, como coagulação, metabolismo e ativação neuroendócrina (ATSUMI et al., 2007; LEVI, 2010; CAPURON, 2011). Uma desregulação do sistema de coagulação induzida por inflamação, por exemplo, agrava os efeitos deletérios da sepse e pode resultar na disseminação letal de coagulação intravascular (HOOK, 2012).

Recentemente, tem sido proposto que a fase inicial de hiperinflamação na sepse é seguida ou sobreposta de um estado prolongado de imunossupressão,

denominado imunoparalisia induzida por sepse (GERMAIN, 2012). Este estado é caracterizado por respostas imunes inata e adaptativa comprometidas e tem papel fundamental na patogênese do dano tecidual, falência de órgãos e morte causada por sepse (HOTCHKISS, 2010). Os mecanismos patofisiológicos da sepse indicam que a forte resposta pró-inflamatória é contrabalançada por citocinas anti-inflamatórias na tentativa de restaurar o equilíbrio imunológico (JUNGER et al., 1996). Mais recentemente, os esforços têm se concentrado em identificar os mecanismos unificadores da sepse inicial e tardia. A sepse leva ao imediato aumento da expressão de PRRs e à ativação de cascatas de transdução de sinal (TANG, 2010). Apesar disso, importantes marcadores pró-inflamatórios, como TNF e IL-1 não mostram padrão consistente em sua expressão gênica e são altamente variáveis entre indivíduos, sugerindo que a resposta do hospedeiro à sepse não é um modelo simples como uma fase inicial pró-inflamatória seguida de uma resposta anti-inflamatória, mas sim um processo altamente interativo e dinâmico (SCHULTE, 2013). O equilíbrio fino e regulado da rede de citocinas e inibidores solúveis de citocinas pró-inflamatórias, como receptores solúveis de TNF (sTNFRs) e antagonistas do receptor de IL-1 (IL-1Ra) é crucial, por um lado, para a eliminação do patógeno invasor e, por outro, na restrição da inflamação danosa ao tecido (VAN DER POLL, 1999), exatamente os fatores cruciais da patofisiologia da sepse.

1.8. TNF- α na sepse

Embora diversas citocinas tenham sido apontadas como relevantes no desenvolvimento e progresso da sepse, a maioria das evidências aponta para TNF como principal mediador dos efeitos fisiológicos observados nessa síndrome (SPOONER, 1992). Endotoxinas como LPS induzem a secreção de TNF por monócitos e macrófagos *in vitro* (BEUTLER et al., 1986) e a injeção de endotoxinas em humanos aumenta os níveis de TNF sérico (CANNON et al., 1990), ao mesmo tempo em que os níveis de TNF sérico se correlacionam com o desenlace da sepse (WAAGE, 1987). De maneira também conclusiva, anticorpos anti-TNF- α tem efeito protetivo em modelos animais, tanto em infecções com bactérias gram-negativas quanto gram-positivas, reduzindo a morbidez e mortalidade da doença (TRACEY et al., 1987).

As evidências da associação de TNF- α com a sepse são vastas. Produtos bacterianos, como LPS e peptidoglicanos, importantes para a patogênese da sepse, são potentes estimuladores de da liberação de TNF- α *in vitro* (ERMERT et al., 2003). Testes *in vitro* também mostram que TNF- α estimula uma variedade de efeitos importante para o desenvolvimento da sepse, como aumento da expressão de moléculas de adesão, ativação da coagulação, potencialização das vias de sinalização inflamatórias e estimulação de vasodilatadores como oxido nítrico (AITKEN, 2011). Em modelos animais e estudos humanos, o desafio com produtos bacterianos ou infecção com bactérias vivas aumenta os níveis de TNF- α , bem como os níveis de sua expressão gênica (CUI et al., 2010). Em alguns modelos *in vivo*, o nível de produção de TNF- α se relaciona diretamente com a magnitude do desafio (REMICK et al., 2000). Os níveis de TNF- α estão aumentados em pacientes sépticos, com mudanças ainda maiores em grupos com maior severidade da doença ou infecção (JADALI, 2010). A administração de TNF- α sozinho em modelos pré-clínicos também foi capaz de produzir disfunções cardiovasculares, pulmonares, renais e hepáticas nos mesmos padrões da sepse (TRACEY et al., 1986). Uma das evidências mais importantes implicando TNF- α na patogênese da sepse, contudo, vem de modelos *in vivo* de sepse na qual a administração seletiva de antagonistas de TNF- α aumentou a sobrevivência e reduziu o dano tecidual. O primeiro desses estudos demonstrou que a administração de soro anti-TNF- α em camundongos aumentou sua sobrevivência ao desafio com LPS (BEUTLER, 1985). Investigações subsequentes pelo mesmo grupo mostraram que a utilização de outras formas neutralizantes de TNF (como anticorpos anti-TNF- α , receptores de TNF solúveis e RNA de interferência) confirmaram os achados do modelo murino, inclusive com uma gama de desafios diferentes, como LPS, punctura e ligação cecal (CLP) e pneumonia (LORENTE, 2005).

Embora a ativação de células e da inflamação pelo TNF- α possa causar danos inflamatórios, sua ação também é crítica para a defesa do hospedeiro em casos de infecção. A inibição de TNF- α tem sido associada com piora na eliminação de micróbios e eventual diminuição da sobrevivência em modelos animais de infecção (ECHTENACHER et al., 2001). Modelos knock-out de TNF também suportam seu papel e importância na defesa do hospedeiro (BELISLE et al., 2010).

1.9. Terapias anti-TNF- α na sepse

Apesar dos efeitos divergentes de TNF- α na defesa do hospedeiro e na resposta inflamatória danosa, relatos de que agentes anti-TNF- α tinham efeito protetivo em modelos animais suportavam sua aplicação clínica na sepse. O primeiro uso proposto de terapias anti-TNF- α foi na sepse, na resposta aguda e grave à infecção, com baixa pressão sanguínea e choque (MAINI et al., 1998).

A neutralização de TNF teoricamente se baseia em dois princípios: a prevenção dos efeitos danosos da citocina nos órgãos afetados e a interrupção da cascata de sinalização inflamatória estimulada pela citocina (WAJANT, 2015). Para efeitos comparativos, o uso de antibióticos ou inibidores de endotoxina durante a progressão da sepse, apesar de removerem os iniciadores da cascata inflamatória, não impedem sua progressão após a iniciação da inflamação, ao passo que TNF (assim como outras citocinas) se mostra crucial como iniciador e mantenedor dos processos pró-inflamatórios, sendo considerado alvo importante e demonstrando benefícios no seu bloqueio para o impedimento do desenvolvimento da doença (BLACKWELL, 1996).

Investigações utilizando esta abordagem terapêutica começaram nos anos 90. Os principais tipos de agentes estudados incluíam anticorpos monoclonais contra TNF- α e receptores solúveis de TNF- α . Ficou demonstrado pelas análises iniciais que, embora estes agentes não mostrassem benefícios em nenhum dos 12 testes clínicos, nos estudos maiores, envolvendo mais de 500 pacientes, a terapia consistentemente mostrava melhora de alguns aspectos clínicos (NATANSON, 1998). Em estudos menores, os efeitos eram mais variáveis e sem resultados significativos, sendo uma das razões pelas quais agentes anti-TNF- α não são rotineiramente utilizados clinicamente contra a sepse (LV, et al., 2014). Uma revisão sistemática dos estudos investigando o uso de inibidores de TNF em modelos de infecção e sepse mostrou que a severidade do desafio séptico (taxa de mortalidade do controle) estava relacionada à efetividade do tratamento (LORENTE, 2005). Em testes clínicos, o uso de agente anti-inflamatórios como Afelimomab (um anticorpo monoclonal anti-TNF- α), demonstrou efeitos benéficos para pacientes com choque séptico e/ou alto risco de morte (PANACEK et al., 2004).

De maneira interessante, uma das terapias anti-TNF- α testadas clinicamente, chamada CytoFab, demonstrou resultados promissores. CytoFab consiste de uma

preparação de fragmentos policlonais Fab derivados do sangue de ovelhas imunizadas com TNF humano recombinante (RICE et al., 2006). Teoricamente, sua natureza policlonal permite que tenha como alvo os múltiplos epitopos de TNF, potencialmente alcançando maiores níveis de neutralização, além de um maior espectro de aplicação em pacientes com polimorfismos no gene de TNF (QIU et al., 2011). Comparado ao placebo, o tratamento com CytoFab induziu melhora de alguns aspectos clínicos, porém sem alterar de maneira significativa as taxas de mortalidade. Na análise de subgrupos, dos 78 pacientes que tiveram os níveis de TNF mensurados, 45% possuíam níveis detectáveis de TNF na data de admissão. Consistente com estudos sugerindo que os níveis de TNF se correlacionam com a severidade da sepse, nos pacientes recebendo placebo, a taxa de mortalidade foi mais alta em pacientes com níveis detectáveis de TNF comparado com os de níveis não-detectáveis (FUGGER et al., 1993). Em pacientes recebendo CytoFab, a taxa de mortalidade foi similar entre pacientes com níveis de TNF detectáveis e não detectáveis. Embora limitados, tais dados sugerem a interpretação que este tipo de terapia tem maior eficácia em pacientes com doenças mais severas, como refletido pelos níveis de TNF circulante (QIU et al., 2011).

Nas duas últimas décadas vários agentes que tem como alvo a modulação das respostas imunes do hospedeiro à infecção bacteriana severa têm sido desenvolvidos. Grande parte obteve sucesso até a fase 2 de testes clínicos, a exemplo de anticorpos anti-TNF- α , apesar da maioria ter falhado em revelar benefícios clínicos em testes clínicos em larga escala (VINCENT, 2003). A única droga licenciada para uso em sepse severa foi a proteína C humana ativada recombinante (rhaPC). A rhaPC induziu efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios na sepse severa. Contudo, o mesmo composto falhou em testes clínicos seguintes, tendo sido recolhido do mercado (BERNARD et al., 2001).

Sepse continua sendo um grande desafio, tanto para médicos quanto para pesquisadores. Apesar dos vários anos de pesquisa intensiva e numerosos estudos clínicos, sua patofisiologia ainda não é completamente entendida, e tratamento anti-citocinas específicas ainda não tiveram sucesso em testes clínicos. Isto se deve principalmente ao fato de que a sepse pode ser caracterizada como uma doença complexa e dinâmica que envolve a combinação das respostas imune e inflamatórias excessivas e suprimidas. Além do mais, ela afeta populações heterogêneas de

pacientes, com diversas etiologias e comorbidades, agravando ainda mais as dificuldades no entendimento e intervenção terapêutica desta síndrome complexa. Não obstante, pesquisas têm elucidado muitos processos patofisiológicos envolvidos na sepse e revelado papéis regulatórios importantes de citocinas pró e anti-inflamatórias na progressão da doença (SCHULTE et al., 2013). Tais descobertas têm levado ao desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Antecipa-se que a pesquisa atual irá expandir nosso conhecimento dos mecanismos atualmente descritos da doença e levar à identificação de novas características patofisiológicas da sepse. Espera-se também que novas estratégias contra sepse continuem a ser avaliadas clinicamente e potencialmente exploradas para um tratamento futuro mais efetivo da sepse.

1.10. Terapias anti-TNF- α : história, efeitos e estado atual

Embora clinicamente diferentes e com peculiaridades em sua patofisiologia, doenças imunes inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide (RA), espondilite anquilosante (AS), psoríase e doença inflamatória do intestino (IBD) respondem de maneira similar a terapias imunobiológicas, especialmente as que tem como alvo TNF- α (VINCENT et al., 2013). Terapias imunobiológicas (assim chamadas por agirem em mediadores e fenômenos naturais e fisiológicos do sistema imune) têm mostrado bons resultados e elevadas taxas de remissão em pacientes. Contudo, apesar da melhora gerada por sua introdução na prática clínica, uma proporção significativa dos pacientes não responde ao tratamento como esperado. Em geral, a falha da resposta se dá de duas maneiras: falha primária, na qual não há resposta à terapia desde o início; e falha secundária, na qual a resposta terapêutica inicial dá lugar ao relapso da atividade da doença (BENDTZEN, 2012). Uma possível explicação para a falha secundária é a imunogenicidade de terapias imunes biológicas. Imunogenicidade se refere à habilidade da molécula de induzir a produção de anticorpos contra si mesma (GARCES, 2013). De fato, todos agentes imunobiológicos são potencialmente imunogênicos, pelo fato de não serem endógenos ao indivíduo tratado (CARRASCOSA, 2013). Anticorpos antidrogas (ADA), por exemplo, podem neutralizar ou degradar/remover a droga correspondente e, assim, reduzir a eficácia do tratamento (ATZENI et al., 2013) (Figura 6).

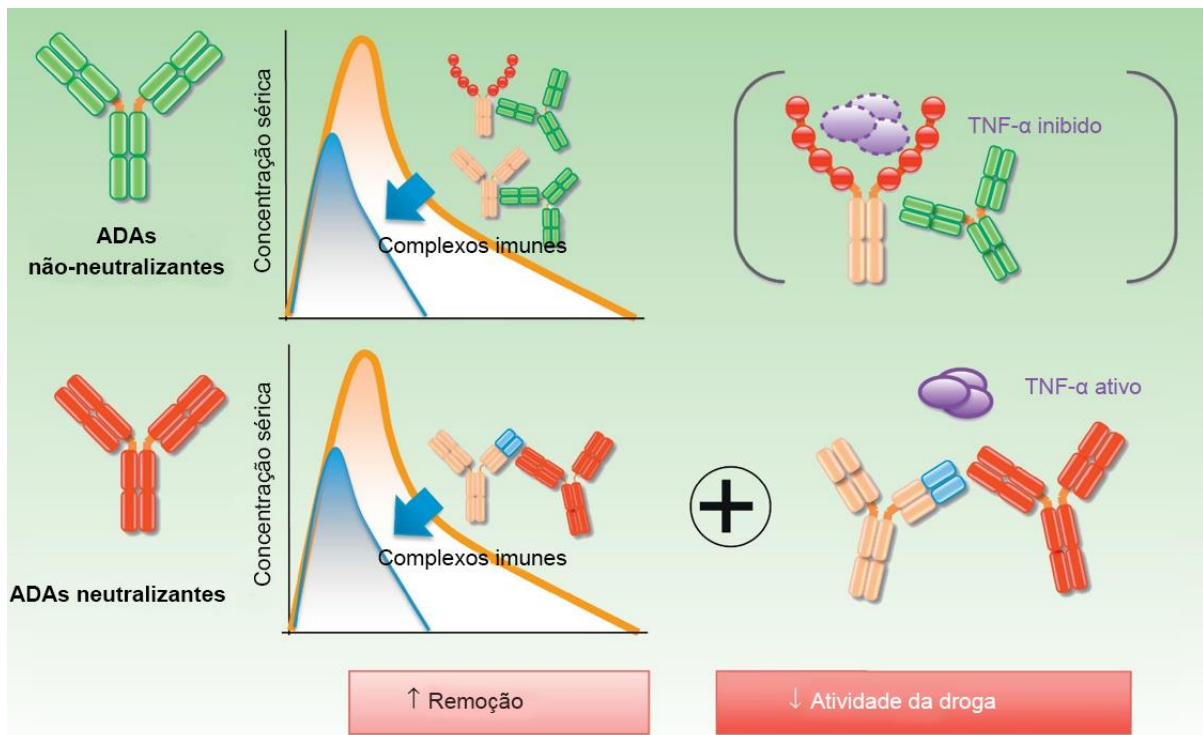


Figura 6. Possíveis efeitos da formação de ADAs sobre anticorpos monoclonais. A eliminação de drogas pode ser acelerada pela remoção de complexos, assim como a atividade da droga pode ser reduzida devido à sua inativação por ADAs. Adaptado de CARRASCOSA, 2013.

O conceito de terapias biológicas imunes inclui anticorpos modificados de origem humana ou animal, e atuam diretamente em moléculas endógenas. Agentes biológicos imunes têm alvos moleculares específicos, como citocinas pró-inflamatórias ou receptores de membrana e visam a modulação da resposta imune inflamatória, se dividindo em três tipos: anticorpos monoclonais (murinos, quiméricos, humanizados ou completamente humanos), porções reconhecedoras de antígeno, e proteínas de fusão contendo fragmentos de anticorpos (TAKEUCHI, 2011). Anticorpos monoclonais foram os primeiros a ser testados como agentes terapêuticos em humanos nos anos 80 (KOHLE, 1975). Contudo, uma grande limitação de seu emprego é a incidência de efeitos adversos pela indução de anticorpos humanos anti-camundongo (BREKKE, 2003). Para superar este obstáculo, fragmentos quiméricos foram desenvolvidos (MORRISON et al., 1984). Estes anticorpos possuem uma região constante humana (Fc) e dois fragmentos de região variável murinos (Fab), com a sequência de aminoácidos humana correspondendo a 75% do total da molécula, consideravelmente reduzindo a imunogenicidade. Contudo, 25% da proteína mantem

a sequência de aminoácidos murina, e estes sítios antigênicos ainda são capazes de induzir a formação dos chamados anticorpos humanos anti-quiméricos (JANI et al., 2014). A partir de 1986, anticorpos monoclonais humanizados emergiram como melhoria destes anticorpos quiméricos, com efeitos adversos reduzidos. Estes anticorpos têm até 95% da sequência de aminoácidos humana (JONES et al., 1986). Infelizmente, apesar do subsequente advento de anticorpos completamente humanizados, a formação de ADAs ainda é observada (MALVIYA et al., 2013). Em paralelo, alternativas foram desenvolvidas baseadas nos fragmentos Fab de anticorpos ou em proteínas de fusão contendo fragmentos de anticorpos monoclonais, devido a seu tamanho reduzido que poderia levar à uma ação mais rápida, juntamente da redução de possíveis efeitos adversos (CHAPMAN, 2002).

Em geral, agentes imunobiológicos tem alta afinidade e especificidade na ligação a suas respectivas moléculas alvo (KRISHNA, 2016). Um dos primeiros fármacos imunobiológicos a surgir no tratamento de RA foi da classe de inibidores de TNF (anti-TNF- α) (TAKEUCHI, 2011). O primeiro relato do tratamento de RA com inibidores de TNF foi em 1993. Infliximab, um anticorpo monoclonal quimérico, aliviou os sintomas e sinais clínicos da atividade inflamatória, incluindo a redução de citocinas circulantes da fase aguda (ELLIOT et al., 1993). Etanercept, uma proteína de fusão da porção Fc de IgG1 e TNFR2 foi, contudo, a primeira droga anti-TNF- α a ser aprovada para o tratamento de RA nos Estados Unidos, em 1998 (TAKEUCHI, 2011). Desde então, oito diferentes fármacos foram aprovados para o tratamento de RA e diversas outras se encontram em diferentes estágios de testes clínicos. Cinco antagonistas biológicos de TNF são atualmente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Três deles são anticorpos monoclonais: Infliximab, Adalimumab e Golimumab. Um deles, uma proteína de fusão: Etanercept. O último, um fragmento Fab conjugado a polietileno glicol: Certolizumab (BORCHERS et al., 2011) (Figura 7).

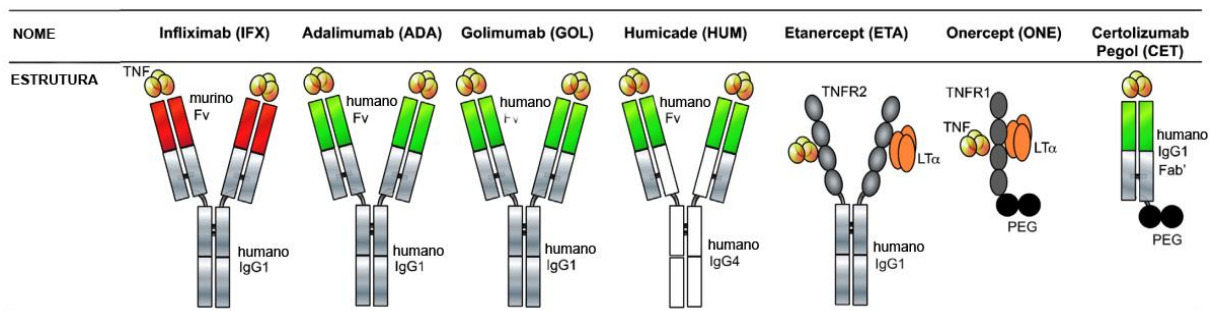


Figura 7. Terapias anti-TNF- α atuais (incluindo biosimilares). Atualmente utilizados ou em desenvolvimento, Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Humicade, Etanercept, Onercept e Certolizumab Pegol são os principais fármacos utilizados para a inibição de TNF- α . Adaptado de MCDERMOTT, 2014.

Funcionalmente, todos compostos supracitados são capazes de bloquear a ligação de TNF- α ao seu receptor, seja por impedimento estérico ou pela sobreposição do epítipo do anticorpo com o ligante/receptor de TNF/TNFR. Assim sendo, todos são agentes de alta afinidade capazes de neutralizar a citotoxicidade causada por TNF- α e sua atividade pró-inflamatória *in vitro* e *in vivo* (SEDGGER, 2014). Contudo, os fármacos anti-TNF- α atualmente utilizados são constructos de proteínas exógenas com o potencial de serem imunogênicos (MCDERMOTT, 2014). Isso também inclui os anticorpos “humanos” ADA e GOL, pois possuem idiótipos de ligação a TNF- α que não fazem parte do repertório normal de anticorpos humano (BENDTZEN, 2015).

Aproximadamente um terço dos pacientes com RA e doença de Chron tratados com inibidores de TNF apresentam falha primária no tratamento (ALLEZ et al., 2010). Além disso, 50% dos pacientes que respondem favoravelmente ao tratamento desenvolvem falha em algum outro ponto (AIKAWA et al., 2010; EMERY, 2012). Estes casos são definidos como falhas secundárias no tratamento. Ainda há muita controvérsia sobre quando e como ocorrem, bem como discussões sobre como este problema deve ser solucionado. Acredita-se que a imunogenicidade seja uma das principais contribuintes para a falha secundária na resposta, devido à alta frequência de formação de ADA em pacientes tratados (BENDTZEN, 2012). A imunogenicidade a antagonistas de TNF- α pode causar reações hipersensíveis locais ou sistêmicas e a formação de complexos imunes, podendo ser, em alguns casos, fatal (BENDTZEN, 2013). Entre os efeitos adversos, hipersensibilidade e imunodeficiência são as reações mais comuns durante o tratamento (HAUSMANN et al., 2010). Com a variabilidade dos casos, a necessidade na mudança das doses administradas e

também do tempo entre doses torna necessário o monitoramento constante da doença e da presença de ADAs para assegurar-se da eficácia e segurança das terapias anti-TNF- α atualmente utilizadas (GARCÉS, 2013).

Na história do desenvolvimento de drogas, é difícil encontrar outro grupo que tenha demonstrado tanta eficácia, especialmente tratando-se de agentes com espectro tão grande de atuação em doenças autoimunes e inflamatórias. Ainda assim, a abundância de casos nos quais a eficácia dos agentes é variável ainda é grande, reiterando os problemas avaliados. Ademais, o custo destes agentes e seu potencial para o desenvolvimento de efeitos colaterais significativos indica uma necessidade urgente na identificação de potenciais de novos agentes anti-TNF- α (THORNE et al., 2017). As vendas de agentes anti-TNF- α chegam a 10 bilhões de dólares por ano, no caso do Adalimumab. De forma conjunta, as diversas abordagens anti-TNF- α chegam à soma de 25 bilhões de dólares por ano, mundialmente, tornando a terapia anti-TNF- α uma das classes de drogas mais lucrativas do mundo (MONACO, 2014) (Figura 8).

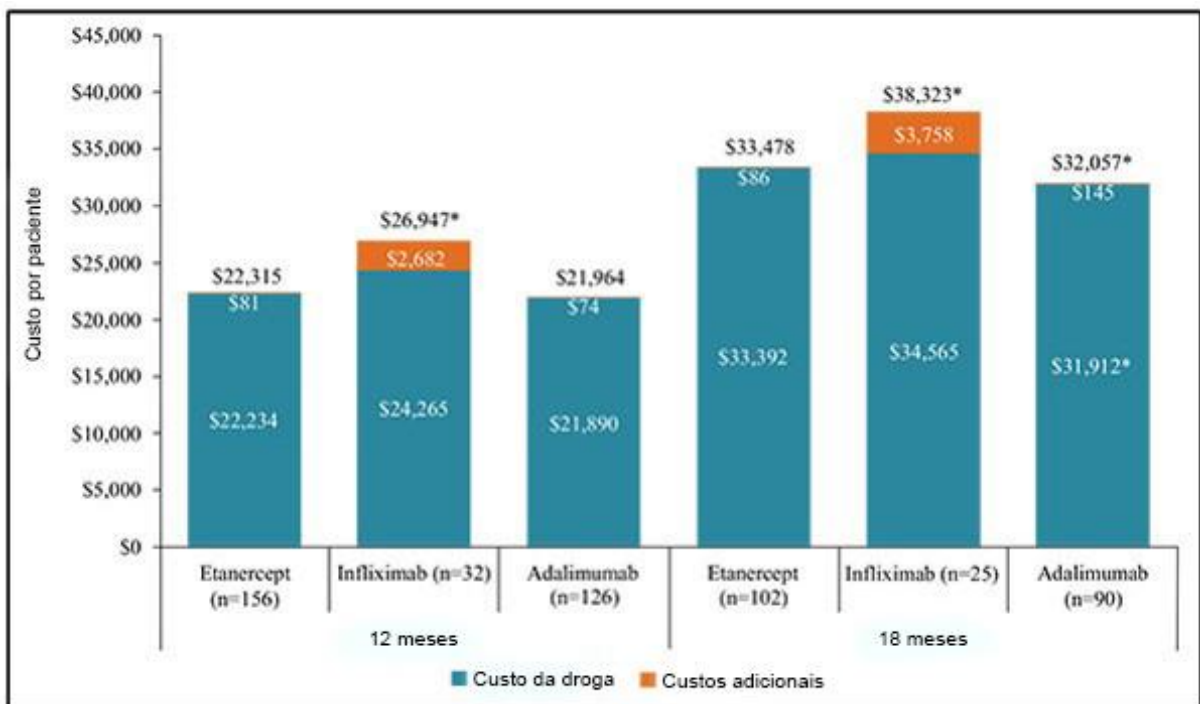


Figura 8. Custos de tratamento de pacientes com terapias anti-TNF- α atuais. Custo médio do tratamento com Etanercept, Infliximab e Adalimumab por paciente em 12 e 18 meses. Adaptado de THORNE, et al., 2017.

1.11. Pequenas moléculas como alternativas para inibição de TNF- α

Devido aos problemas recorrentes encontrados em terapias anti-TNF- α baseadas em anticorpos, um grande número de moléculas pequenas têm surgido, com o objetivo de inibir a síntese de TNF- α , ou bloquear sua atividade (CARTER et al., 2001; HE et al., 2005; MA et al., 2014). Pequenas moléculas inibidoras têm o potencial de se tornarem a nova fronteira no tratamento de doenças inflamatórias, considerando seu menor custo de produção e prospecção através de programas de modelagem contemporâneos e modernos (MA et al., 2014). Alguns compostos já demonstram sucesso em sua aplicação *in vitro* e confirmam potenciais alvos de interação com TNF- α e TNFR (CARTER et al., 2001; HE et al., 2005). Um novo composto anti-TNF- α sintetizado, C87, se liga diretamente ao TNF- α e previne a sinalização via TNFR pela inibição de JNK e NF κ B, inibindo a produção de citocinas induzidas por TNF- α (MA et al., 2014). Sua atuação em modelos animais foi também comprovada na inflamação hepática induzida por LPS em camundongos. Esta é uma das poucas moléculas com atividade reportada com eficácia *in vivo*.

Uma das primeiras moléculas a ser testada como inibidora da produção de TNF- α foi a talidomida, já aprovada pelo FDA para tratamento do câncer e da artrite reumatoide (RAJKUMAR, 2001). Entre os efeitos da droga, está a inibição direta da síntese de citocinas envolvidas no crescimento tumoral, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (DENG, 2003). É importante notar que a talidomida tem um histórico de efeitos adversos em humanos, incluindo má-formação congênita, que ressalta os limites dos testes clínicos atualmente utilizados para aprovação de novas drogas, visto que em modelos animais a talidomida não induz tal efeito (KLUG et al., 1994). Apesar disso, estudos avaliando seu potencial de tratamento da doença de Chron tem mostrado sucesso terapêutico. Nos casos mais recentes, a talidomida administrada em baixas doses induziu respostas benéficas entre 67 e 80% dos pacientes, com remissão da doença entre 30 e 50% dos mesmos (MAJUMDER, 2012).

A partir dos resultados com talidomida, outros compostos foram desenvolvidos para o tratamento de doenças inflamatórias, denominados drogas inibitórias seletivas de citocinas (DREDGE, 2002). Tais moléculas tem mostrado potencial de inibição de fosfodiesterase 4 (PDE-4), indiretamente diminuindo a produção de TNF- α . O uso de

inibidores de PDE tem mostrado boa eficácia no tratamento de uma gama de modelos inflamatórios, incluindo asma e artrite reumatoide (SPINA, 2003).

Outra metodologia explorada no desenvolvimento de pequenas moléculas na inibição da produção de TNF- α é a procura por moléculas capazes de interferir nas vias de transdução de sinal que levam à ativação de NF κ B, majoritariamente regulado por quinases, como ERK, JNK e MAPKs, que têm papéis centrais na regulação da produção de TNF- α (PALLADINO et al., 2003). O papel de p38 MAPK foi descrito por estudos sobre a sinalização de LPS com o intuito de descobrir novos alvos para terapias anti-inflamatórias (HAN et al., 1993). Em 1993, a companhia SmithKline Beecham patenteou o uso de alguns derivados de imidazol com potencial ação de inibição da produção de TNF- α a partir da regulação dos níveis de p38 MAPK (Smithkline Beecham Corporation, 1993). Estudos mais recentes com compostos SB203580 e SB220025 confirmaram a ação dos mesmos como inibidores de p38 MAPK in vitro, demonstrando diversos efeitos anti-inflamatórios em modelos murinos (PALLADINO et al., 2003). A continuidade do processo de desenvolvimento de tais compostos, contudo, foi impedido devido à falta de especificidade e/ou toxicidade associada ao seu uso. Outros compostos inibidores de p38 MAPK foram posteriormente desenvolvidos e inclusive adquiridos por grandes empresas farmacêuticas, como Johnson & Johnson (PALLADINO et al., 2003) (Figura 9).

Em conjunto, os exemplos supracitados mostram a possibilidade real do desenho e síntese de pequenas moléculas inibidoras específicas de TNF/TNFR e sua sinalização, apesar de atualmente nenhuma delas estar disponível ou aprovada para uso terapêutico (PALLADINO et al., 2013), de tal forma que a indústria farmacêutica continua com a busca por moléculas capazes de inibir a produção e/ou ação do TNF de maneira específica, que induza poucos ou nenhum efeito adverso e que seja fisiologicamente bem tolerada; uma combinação de desafios que torna a busca difícil, porém não impossível (SEDGGER, 2014).

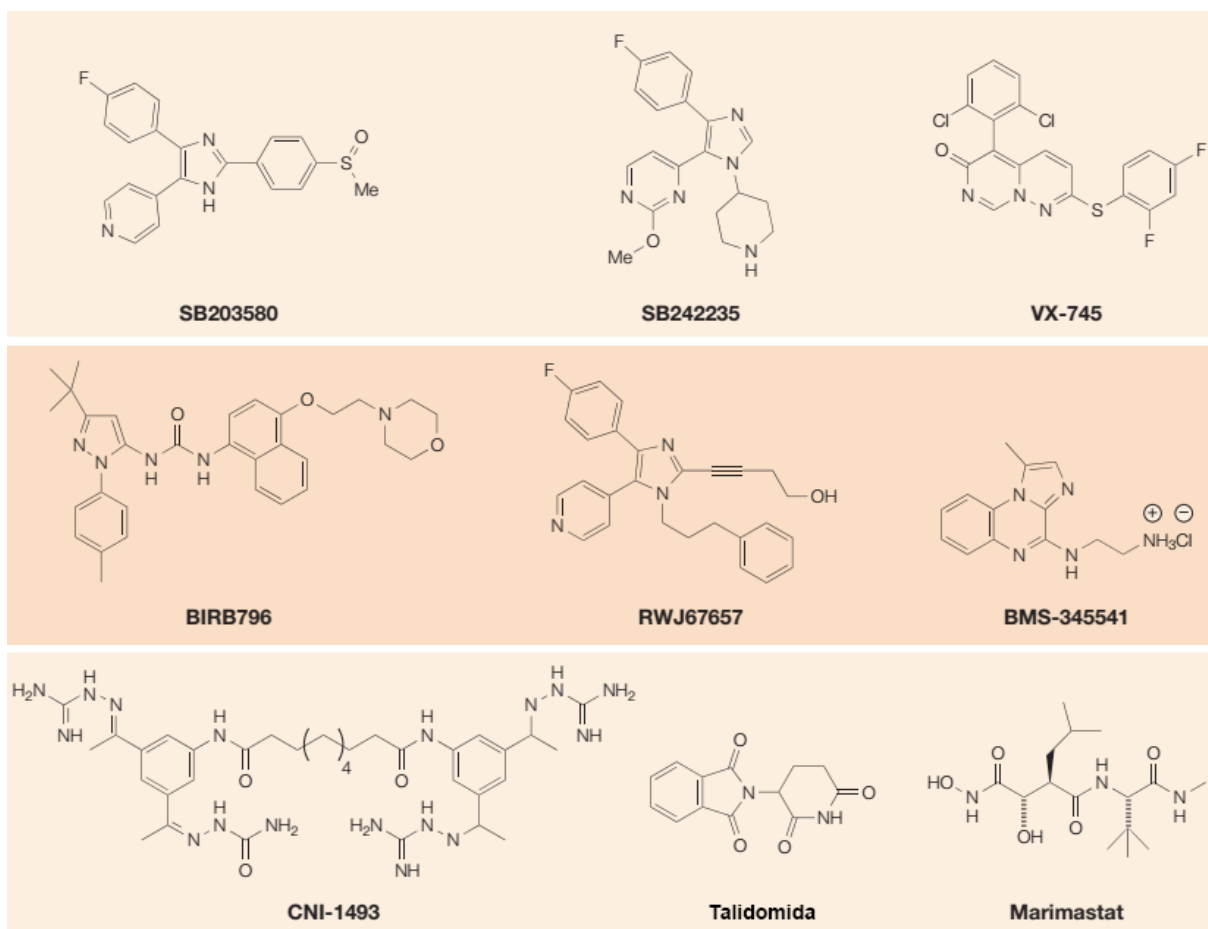


Figura 9. Exemplos de pequenas moléculas inibidoras da produção de TNF- α . Diferentes moléculas produzidas com o intuito de inibir a produção de TNF- α . Adaptado de PALLADINO et al., 2013.

1.12. Prospecção de imidazopiridinas e seus derivados

A classe dos compostos heterocíclicos (a maior e mais variada classe de compostos orgânicos) tem demonstrado cada vez mais importância na química aplicada (PORDEL et al., 2017). Compostos heterocíclicos contendo nitrogênio em sua composição, em especial, são importantíssimos para o desenho de fármacos e constituem o núcleo de diversos produtos naturais (PORDEL et al., 2017). O desenvolvimento de reações multicomponente (MCRs) - descrita em 1983 por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1893) – e suas aplicações para a produção de diversos compostos com atividade biológica tem promovido a expansão da gama de ferramentas de síntese de bibliotecas de compostos bioativos através da síntese orientada por diversidade (DOMLING, 2012). O uso de metodologias catalíticas aplicadas nas MCRs tem facilitado o acesso a novas bibliotecas de pequenas

moléculas heterocíclicas com potencial de aplicação biológica (BIGGS-HOUCK, 2010; BAGDI et al., 2015). A diversidade e fácil acesso a um grande número de compostos faz de MCR uma ferramenta muito importante na síntese orgânica moderna (GUO et al., 2015). Dentre estas moléculas, o núcleo de imidazopiridinas se caracteriza por possuir propriedades biológicas importantes e promissor potencial farmacológico. (DYMIŃSKA, 2015) (Figura 10). Imidazopiridinas são estruturas contendo unidade imidazol em fusão a um anel piridínico, apresentando diferentes formas de acordo com a posição do nitrogênio no anel (Figura 11).

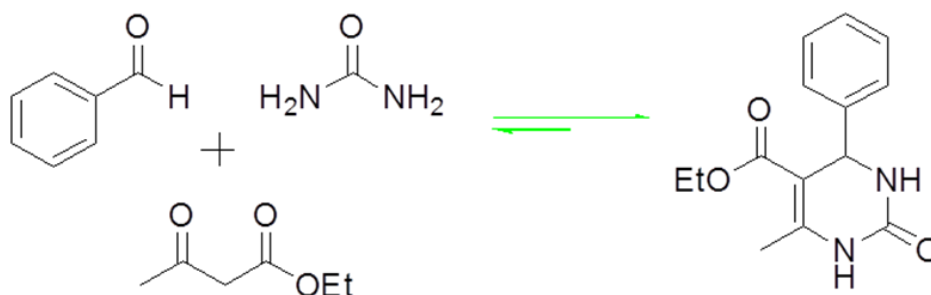


Figura 10. Esquema do mecanismo de obtenção de derivados de imidazopiridinas por MCR. A reação multicomponente se baseia na adição de diversas cadeias laterais à um núcleo específico, no caso, de imidazopiridina. Sucessivas reações complementam a molécula até o resultado final. Adaptado de ALVIM, 2017.



Figura 11. Diferentes estruturas possíveis para a síntese de derivados de imidazopiridinas. Estruturas distintas derivadas de imidazopiridinas podem ser sintetizadas, dependendo da posição dos átomos de nitrogênio no anel de cinco membros. Adaptado de ALVIM, 2017.

Imidazopiridinas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória, antiepilética, analgésica e antiparasitária (HONERJÄGER et al., 1989; EL-SAYED et al., 2013). O tratamento de distúrbios como depressão, insônia e com função hipnótica também fazem uso de compostos baseados em imidazopiridinas, como Zolpidem e Alpidem (MONTI et al., 2017; BOTTAÏ et al., 1995) (Figura 12). Além do tratamento de

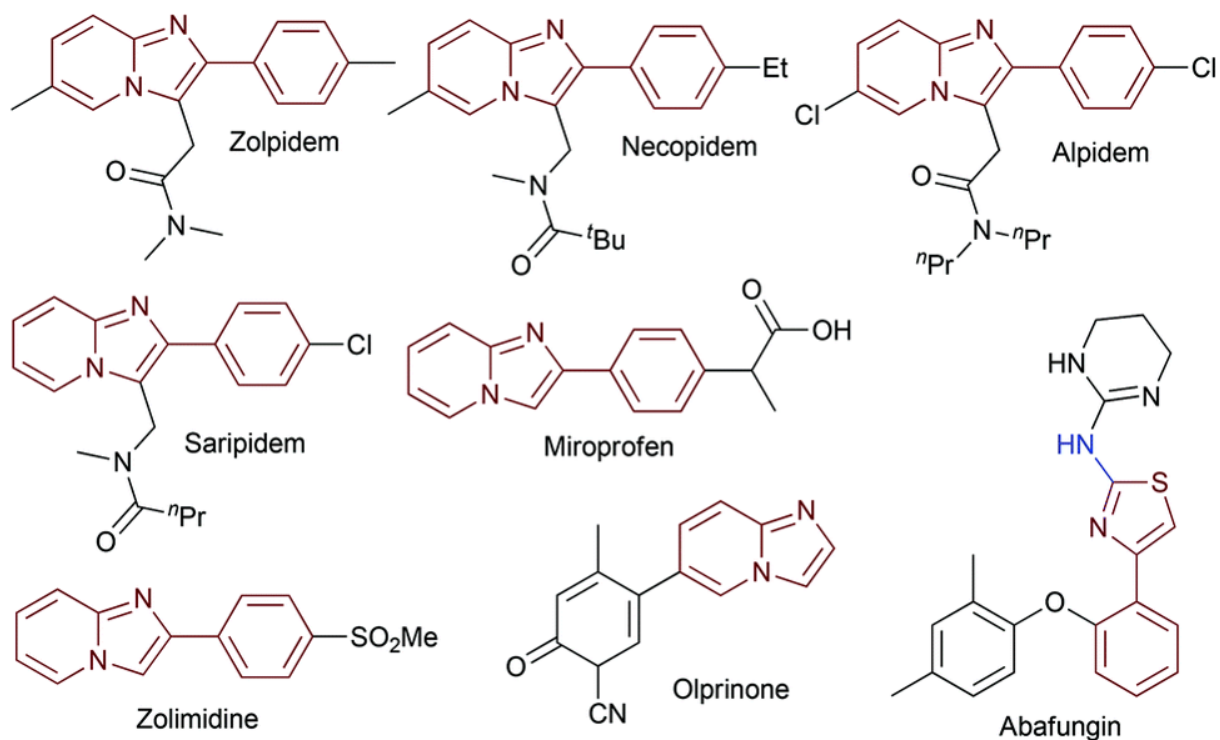


Figura 12. Exemplos de derivados de imidazopiridinas atualmente empregados como fármacos.

Derivados de imidazopiridinas atualmente representam uma classe diversa com aplicação em diversos distúrbios psicológicos, como depressão e insônia. Adaptado de SHINDE, 2016.

distúrbios neurológicos, outros compostos derivados de imidazopiridinas, como Olprinona são utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca, aspecto também presente em diversas doenças inflamatórias, como a sepse (UEDA, 2006). Ainda no âmbito de doenças relacionadas a condições de inflamação crônica e ao sistema imunológico, o ácido minodrônico é atualmente utilizada para tratamento de osteoporose, ao passo que o composto GSK812397 se encontra em fase de testes clínicos para o tratamento de infecções, a exemplo do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DAR, 2015). Devido à potencial gama de aplicações de derivados de imidazopiridinas, seu desenvolvimento metodológico tem se expandido significativamente (GOEL, 2015; PORDEL et al., 2017). Em geral, os estudos publicados visam a obtenção de imidazopiridinas aromáticas, com pouca discussão em torno do uso do núcleo de imidazopiridinas de forma saturada ou parcialmente saturada, com poucos exemplos de síntese e aplicação deste tipo de compostos (SHAO, et al., 2008; XIAO, et al., 2010).

Nos últimos anos, derivados de imidazopiridinas vêm sendo sintetizados com maior frequência. Apenas em 2010 foi descrita a primeira síntese dos sistemas de anéis hexahidroimidazo[1,5-b]isoquinolina, mesmo ano em que derivados de hexahidroimidazo[1,2-a]piridina foram relatados como compostos moduladores de receptores de glicocorticóides com potencial utilização no tratamento de doenças inflamatórias (XIAO et al., 2010). Outras atividades anti-inflamatórias de diferentes derivados têm sido descritas, como a inibição de proteína quinase B (PKB ou AKT, sinalizadora de proliferação celular, sobrevivência e resposta ao estresse inflamatório) (ASHWELL et al., 2012), inibição de leucotrieno A4 hidrolase (GRICE et al., 2008) e inibição de COX-2 (ZARGHI, 2012).

Em especial, imidazopiridinas comprovadamente inibem a expressão de citocinas inflamatórias (entre elas, TNF- α) em diversos modelos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RETHEER et al., 2008; CHEN et al., 2013; LACERDA et al., 2014). Tais moléculas foram capazes de interferir nas vias de sinalização que levam à expressão do gene de TNF- α , sem, contudo, estabelecer uma clara relação entre a estrutura e atividade dos compostos, com alvos celulares ainda desconhecidos (RETHEER et al., 2008). Outros compostos demonstram estado mais avançado de desenvolvimento, como as moléculas LASSBio-1749 e LASSBio-1504, vantajosas em sua aplicação na inibição da produção de TNF- α quando comparadas a compostos previamente testados, como SB-203580, evidenciando, inclusive, menor citotoxicidade. Atualmente a eficácia de LASSBio-1749 no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como modelos de artrite em murinos, passa por estudos de comprovação de seu potencial terapêutico (LACERDA et al., 2014). Entre os mais promissores derivados de imidazopiridinas, X22, descrito em 2013, apresenta marcante atividade inibitória da produção de TNF- α no modelo de macrófagos estimulados com LPS (CHEN et al., 2013). Com baixa concentração de uso e efeitos adicionais como a inibição da produção de IL-6, X22 tem ação comprovada na prevenção de lesões de isquemia e reperfusão de retina (por inibição de MAPKs), lesão cardíaca causada por obesidade (regulando a ativação de NF κ B e a produção de espécies reativas de oxigênio) e na atenuação de lesões arteriais induzidas por dietas com alto conteúdo de gordura (BIAN et al., 2015; LI et al., 2015; QIAN et al., 2016). Embora o mecanismo anti-inflamatório e alvos moleculares específicos ainda sejam desconhecidos, os efeitos

benéficos de imidazopiridinas na inflamação induzida por LPS são objetos de pesquisa contínua.

Assim sendo, derivados de imidazopiridinas são promissores como base para o desenvolvimento de novos fármacos como agentes anti-inflamatórios. Mais estudos devem incluir o teste destes novos compostos anti-inflamatórios em outros modelos animais e examinar os mecanismos moleculares subjacentes e alvos diretos a nível transcricional e pós-transcricional, avaliando as atividades de novos derivados de imidazopiridinas contra doenças inflamatórias com alto impacto clínico (a exemplo da sepse) (CHEN et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A inflamação, em seu contexto fisiológico, tem papel benéfico e homeostático ao organismo. Não obstante, o conjunto de patologias denominadas doenças inflamatórias, cuja característica fundamental é a desregulação deste processo, constitui um problema de saúde pública em escala mundial. Mesmo com o crescente número de estudos dedicados ao assunto, patologias como artrite reumatoide, doença de Chron e sepse continuam a atingir uma parcela significativa da população, sem distinção entre etnia ou faixa etária.

Despontando como patologia de maior risco, a sepse afeta mais de 30 milhões de indivíduos por ano, mundialmente, tirando 8 milhões de vidas, incluindo mais de 3 milhões de crianças a cada ano (FLEISCHMANN et al, 2016). Devido à progressão rápida da doença, a mortalidade aumenta em torno de 8% a cada hora de atraso no tratamento, sendo que até 80% dos casos poderiam ser prevenidos com diagnóstico e tratamento rápido (KUMAR et al., 2006). Apenas nos Estados Unidos, a sepse mata um indivíduo a cada 2 minutos, mais do que o câncer de próstata, o câncer de mama e a AIDS combinados (RHEE et al., 2017). Somado a isto, estão os custos da hospitalização dos pacientes, cuja média é de U\$18.400,00, o dobro da média de outras doenças (PFUNTNER, 2013). Somente nos Estados Unidos, os gastos chegam à soma de U\$27.000.000,00 por ano (AREFIAN et al., 2017).

Devido a esta proporção, um melhor entendimento da relação entre TNF- α e o balanço de citocinas a ele associadas que participam do estabelecimento e progressão da sepse (SCHULTE, 2013) é essencial para a mudança deste quadro. Apesar dos avanços no desenvolvimento de novas terapias contra sepse e outras doenças inflamatórias, a maioria dos medicamentos disponíveis é pouco eficiente ou carrega com si uma gama de efeitos adversos, tornando o tratamento convencional bastante ineficaz.

Dentre as opções atuais mais promissoras, destacam-se as imunoterapias que têm como alvo a inibição de TNF- α . Efeitos adversos graves, se associam ao uso destas terapias, como a propensão a infecções e a imunogenicidade, resultando na formação de anticorpos anti-droga, principais suspeitos da falha secundária na resposta. Assim, o desenvolvimento de uma nova geração de compostos para o

tratamento de doenças inflamatórias, que gerem menos efeitos adversos e tenham menor custo de produção, se torna essencial. A tendência atual de desenvolvimento é o desenho racional de fármacos para a síntese de pequenas moléculas que apresentem grande eficiência na inibição de TNF- α e redução de efeitos adversos.

Até o momento, não foi relatado nenhum sucesso clínico da aplicação de fármacos baseados em pequenas moléculas na inibição da produção de TNF- α , o que suporta o esforço empreendido neste trabalho de prospecção biológica da atividade de pequenos compostos sintéticos, de produção nacional, e a avaliação quanto à sua atividade esperada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho se propõe a investigar o potencial de oito derivados de imidazopiridinas como inibidores da produção de TNF- α nos modelos *in vitro*, utilizando a linhagem celular U-937 e macrófagos peritoneais e *in vivo* de sepse; bem como a sua participação na modulação de citocinas associadas ao TNF- α .

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Analisar o efeito dos derivados na inibição da produção de TNF- α *in vitro*.

3.2.2. Avaliar e selecionar os derivados de imidazopiridinas quanto à citotoxicidade de sua aplicação em modelos celulares *in vitro*.

3.2.3. Analisar a capacidade dos derivados de regular a ação de proteínas e fatores de transcrição relacionados à síntese de TNF- α .

3.2.4. Determinar a capacidade dos derivados de interferir nas vias de regulação da síntese de TNF- α mediadas por cAMP e NO.

3.2.5. Identificar o padrão de expressão de citocinas de células tratadas com os derivados a fim de traçar um perfil pró ou anti-inflamatório da resposta imune inata

3.2.6. Analisar o potencial de aplicação dos derivados no modelo *in vivo* de sepse, por avaliação de seu potencial protetivo sobre injeção com doses letais de LPS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fluxograma

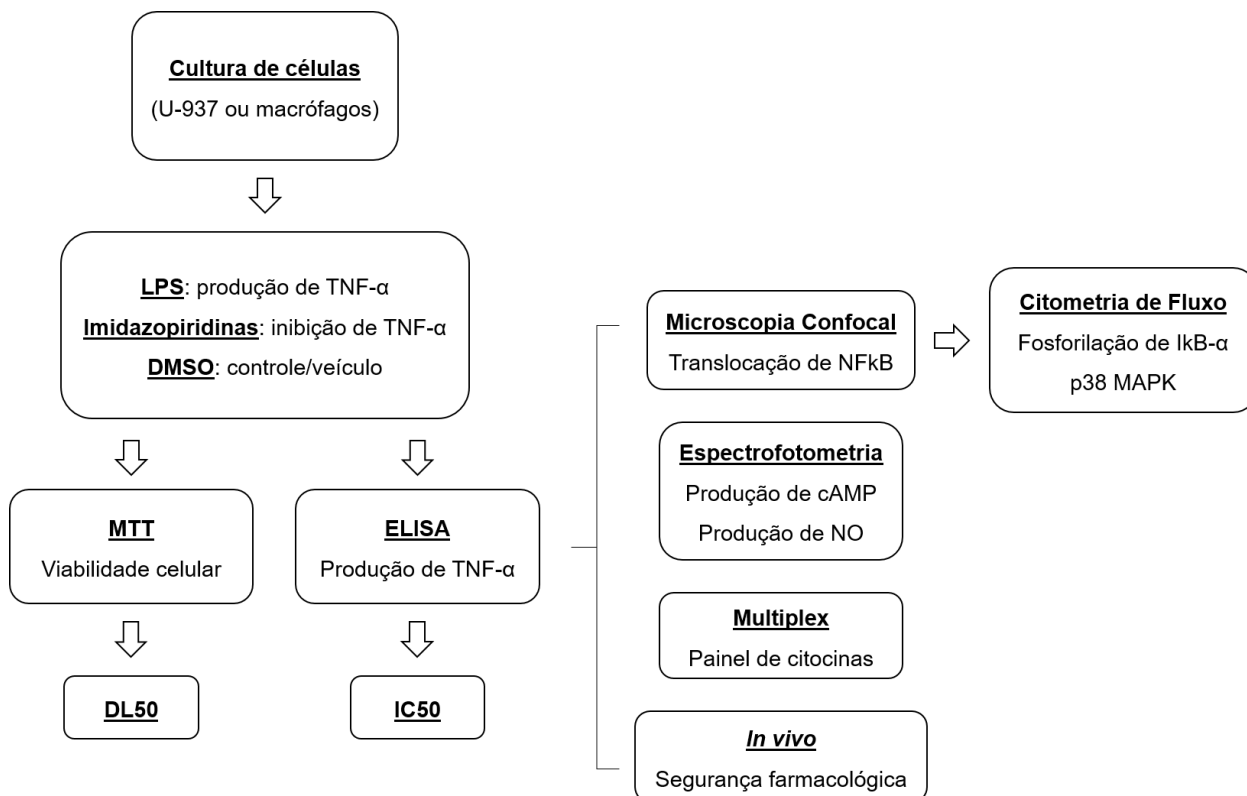


Figura 13. Desenho experimental esquemático. Resumo das metodologias utilizadas.

4.2. Reagentes e equipamentos

Para o cultivo celular, foram adquiridos meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, e soro fetal bovino (SFB) da empresa Gibco – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Além disso, utilizou-se antibiótico Penicilina-Estreptomicina (P4333), da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para estimulação das células, foram utilizados forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, P8139) e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* K-235 (LPS, L2143), ambos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os anticorpos primários utilizados foram: NFκB p65 Antibody (C-20) (SC-372), p-IκB-α Antibody (B-9) (SC-8404) e p38α Antibody (9F12) (SC-81621), da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos secundários utilizados

foram IgG de cabra anti-coelho – Alexa Fluor 546 (A-11010) e IgG de cabra anti-camundongo Alexa Fluor 488 (A-28175), ambos da Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). O anticorpo conjugado utilizado foi CD14 Monoclonal Antibody (TuK4), APC-Alexa Fluor 750, da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Como controle isotípico foi utilizado o anticorpo IgG (SC-2027) da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA). Como marcadores fluorescentes foi utilizado DAPI (32670), obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Para análise da viabilidade celular, utilizou-se MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Para os ensaios de imunofluorescência, utilizou-se Triton X-100 (X100) para permeabilização da membrana celular e Albumina de Soro Bovino (BSA) (A2153) da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) para prevenção de ligação não-específica dos anticorpos, e meio de montagem anti-decaimento de fluorescência, ProLong Gold (P36934), da Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Diferentes *kits* foram utilizados: “Human TNF-alpha ELISA Kit, EZHTNFA”, da Merck Millipore (Billerica, MA, EUA) para análise de TNF- α por ELISA; “cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System”, da Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra), para análise dos níveis de cAMP e “HT17MG-14K-PX25”, da Merck Millipore (Billerica, MA, EUA), para análise de diversas citocinas por multiplex.

A leitura de absorbâncias foi realizada no leitor de microplacas Spectramax M5, com análise dos dados realizada pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC (Sunnyvale, CA, EUA). O ensaio de multiplex foi realizada no Bio-plex 200, da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). O citômetro de fluxo utilizado foi o BD FACSVerser, da BD Biosciences, Inc., com a análise dos dados realizada no programa FlowJo v.10.4, da Tree Star, Inc. (Ashland, OR, EUA). As imagens de imunofluorescência foram obtidas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser SP5, da Leica (Wetzlar, HE, Alemanha).

O processo de solubilização dos compostos iniciou-se com a pesagem dos mesmos para determinar a quantidade de solvente necessária para a produção de estoques de 100mM. A solubilização dos compostos se deu inicialmente em solvente

orgânico (DMSO) para a produção dos estoques a 1M, com subsequente diluição dos compostos em meio de cultura RPMI 1640, para a produção do estoque a 100mM.

4.3. Derivados de imidazopiridinas

Um total de onze compostos foi sintetizado contendo o núcleo de imidazopiridina e alterando-se as cadeias laterais para obter derivados com potencial atividade anti-inflamatória. Os derivados foram sintetizados pela reação de Biginelli, desenvolvida por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1893), com aprimoramentos descritos por ALVIM, 2017. A síntese foi desenvolvida e realizada pelo Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica (LAQMET) da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Brenno Amaro Da Silveira Neto. Apenas oito compostos foram utilizados durante o trabalho, devido à problemas de solubilização de três deles (feita em DMSO). Os compostos foram nomeados como 4B, 4C, 4D, 4F, 4G, 4I, 4J e 4K por convenção do laboratório. As estruturas moleculares se encontram no Anexo 1.

4.4. Cultura de células

Células de linhagem de linfoma histiocítico humano U-937 (ATCC CRL-1593), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB, 100.000 U/L de penicilina e 100mg/L de estreptomicina e mantidas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Passagens eram feitas ao atingir 90% de confluência.

Macrófagos peritoneais foram isolados de camundongos C57BL/6, por lavagem do peritônio com meio de cultura RPMI 1640 (3mL) e subsequente centrifugação (1500 RPM por 5 minutos) e lavagem com PBS 1X. As células foram então semeadas em placas de 24 poços e incubadas a 37°C por 24 ou 48 horas, para aderência. Antes da realização dos experimentos, o meio de cultura era renovado.

4.5 Tratamentos

Previamente aos experimentos, as células U-937 foram tratadas com PMA (5ng/mL), por 72 horas, para diferenciação em macrófagos. O estímulo para liberação

de TNF- α foi feito com LPS, na concentração de (1 μ g/mL), por 24 horas. Para análise de sua atividade, foram testados 8 derivados de imidazopiridinas previamente sintetizados pelo LAQMET. Os compostos foram utilizados em diversas concentrações, entre 500 μ M e 10nM, no tempo de 24 horas em conjunto com o tratamento com LPS, com exceção do experimento *in vivo* onde também foram aplicados sozinhos. Como controles experimentais, foram utilizadas células mantidas em meio de cultivo e tratadas com o veículo (DMSO \leq 0,01% diluído em PBS 1X).

4.6. Avaliação da diferenciação de monócitos

A avaliação do sucesso na diferenciação de células monocíticas U937 foi feita pela análise da expressão de CD14 na superfície celular. CD14 é uma proteína de membrana expressa em macrófagos e serve como marcador da diferenciação de monócitos em macrófagos.

3 \times 10⁵ células U-937 foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamento, as células foram removidas, lavadas três vezes com PBS 1X e marcadas com anticorpo anti-CD14-APC-Alexa Fluor 750 diluído em solução de bloqueio (1% de BSA em PBS) numa concentração final de 1:60 por 30 minutos, a 4°C. Para análise em citômetro de fluxo, as células foram ressuspendidas em PBS.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisada a fluorescência no canal FL3 em escala logarítmica. A análise dos dados foi realizada usando a porcentagem de células positivas para CD14 dentro da população. Para controle experimental, células marcadas com isótipos (IgG) foram consideradas como negativas para a marcação.

4.7. Análise da viabilidade celular

A viabilidade das células U-937 e macrófagos peritoneais foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante.

3 \times 10³ células U-937 ou macrófagos peritoneais foram semeadas por poço, em placas de 96 poços e incubadas overnight a 37°C. As células foram então tratadas com diferentes concentrações de cada derivado de imidazopiridina, LPS, ou foram

mantidas apenas com meio de cultivo. Após 24 horas, os poços foram incubados por 4h, no escuro e a 37°C, com 150µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e em seguida esta solução foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados à cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi lida a 540nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). Os ensaios foram feitos em triplicata e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de inibição foi determinada comparando a densidade celular das células tratadas com as células controle no mesmo período de incubação.

4.8. Avaliação da produção de TNF- α

A detecção dos níveis de produção de TNF- α foi feita utilizando o ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), segundo as recomendações do fabricante. Sobrenadantes de células U-937 e macrófagos peritoneais foram analisados para a produção e liberação de TNF- α após tratamento com LPS e derivados de imidazopiridina.

3x10⁵ células U-937 ou macrófagos peritoneais foram semeadas por poço, em placas de 24 poços e tratadas por 24 horas com 1µg/mL de LPS, em conjunto ou não com diferentes concentrações dos derivados de imidazopiridinas. Após 24 horas, o sobrenadante dos poços foi coletado, centrifugado para a remoção de debris e armazenado a -20°C. Inicialmente, a placa do ensaio de ELISA foi lavada quatro vezes com 300µL tampão de lavagem (volume constante em todas as etapas de lavagem). Aos poços foram então adicionados 50µL do tampão de ensaio e, posteriormente, 50µL da curva-padrão ou das amostras foram adicionados aos poços, sendo a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. O conteúdo foi então descartado e a placa lavada quatro vezes com tampão de lavagem. 100µL do anticorpo de detecção anti-TNF- α foram adicionados aos poços e a placa incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. O conteúdo da placa foi descartado e a placa lavada quatro vezes com tampão de lavagem. 100µL da solução de avidina conjugada com peroxidase foram adicionados aos poços e a placa incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação. O conteúdo da placa foi descartado e a placa lavada quatro vezes com tampão de lavagem. Foram então adicionados 100µL da solução de substrato à cada poço e a placa incubada por 15 minutos protegida da luz. A reação foi então interrompida adicionando 100µL da solução de parada à cada

poço. A absorvância foi lida a 450nm e 570nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA).

4.9. Avaliação da translocação de NFkB por imunofluorescência

Para microscopia confocal de fluorescência, 3×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço e lamínulas em seu interior. Após tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e fixadas com Formalina 3,7% *overnight*, a temperatura ambiente. Após retirada da Formalina, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS 1X e, em seguida, permeabilizadas com 0,2% Triton X-100 em PBS 1X por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se solução de bloqueio (2,5% de BSA em PBS 1X) por 20 minutos, em temperatura ambiente.

NFkB foi marcado com anticorpo anti-NFkB na diluição de 1:250 e 5µg/ml de anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 546, diluídos em solução de bloqueio (1% de BSA em PBS 1X). Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C, em câmara úmida. O núcleo foi marcado com DAPI, na concentração final de 300nM. As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem anti-decaimento de fluorescência.

4.10. Quantificação de proteínas intracelulares por citometria de fluxo

A quantificação da expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização iniciadas pela ligação de LPS ao TLR4 foi feita através da citometria de fluxo e do uso de anticorpos específicos anti-IkB-α fosforilada e anti-p38-MAPK-α fosforilada.

3×10^5 células U-937 foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1mL de meio de cultura por poço. Após tratamentos, as células foram removidas, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,2% Triton X-100 em PBS 1X por 20 minutos, a temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se solução de bloqueio (2,5% de BSA em PBS 1X) por 20 minutos, a temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram adicionados na concentração de 1 µg/ 1×10^6 células, diluídos em solução de bloqueio (1% de BSA em PBS 1X) e incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram

lavadas três vezes com PBS 1X e ressuspendidas em PBS para análise em citômetro de fluxo.

Foram adquiridos 10.000 eventos e analisadas as fluorescências no canal FL1 em escala logarítmica. A análise dos dados foi realizada usando a média de fluorescência de cada amostra. Para controle experimental, células marcadas com isotipos (IgG) foram consideradas como negativas para a marcação.

4.11. Avaliação da produção de óxido nítrico de sobrenadante celular

A avaliação da produção de NO é realizada de forma indireta, por meio da quantificação de nitrito (NO₂⁻) pelo método “Ensaio de Griess”. A quantificação de NO é indireta em razão da extremamente rápida decomposição do NO no sangue e em outros fluídos, principalmente na forma de nitrito.

3x10⁵ células U-937 ou macrófagos peritoneais foram semeadas por poço, em placas de 24 poços e tratadas por 24 horas com 1µg/mL de LPS, em conjunto ou não com diferentes concentrações dos derivados de imidazopiridinas. Após 24 horas, o sobrenadante dos poços foi coletado, centrifugado para a remoção de debris e armazenado a -20°C. Para a quantificação de NO, foi utilizado o ensaio de Griess, que detecta a presença do íon nitrito em solução, resultado da degradação de NO. Após o preparo da curva-padrão, a mesma foi pipetada em uma placa de 96 poços. Em seguida, 50µL das amostras foram pipetadas em seus respectivos poços. Fez-se então a aplicação de 50µL do reagente de Griess a todos os poços, incubando de 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente, protegido da luz. A absorbância foi lida a 540nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA).

4.12. Quantificação dos níveis de cAMP

A detecção dos níveis intracelulares de cAMP foi feita utilizando o sistema de ensaio imunoenzimático (EIA), segundo as recomendações do fabricante. Sobrenadantes de células U-937 e macrófagos peritoneais foram analisados para a produção de cAMP após tratamento com LPS e derivados de imidazopiridina.

3×10^3 células U-937 foram semeadas por poço, em uma placa de 96 poços e incubadas overnight a 37°C . As células foram então tratadas com diferentes concentrações de cada derivado de imidazopiridina, LPS, ou foram mantidas apenas com meio de cultivo. A placa foi então centrifugada a 1500 RPM por 3 minutos e o excesso de meio retirado. As células foram ressuspensas em $200\mu\text{L}$ de solução de lise e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Após a preparação da curva-padrão, $100\mu\text{L}$ das amostras foram adicionadas aos poços. Sobre estas, foi adicionado $100\mu\text{L}$ da solução de detecção e a placa foi incubada a 4°C por 2 horas. $50\mu\text{L}$ de cAMP associado a peroxidase foram pipetados em todos os poços e a placa foi incubada a 4°C por 1 hora. A placa foi então lavada quatro vezes com $400\mu\text{L}$ de tampão de lavagem e posteriormente $150\mu\text{L}$ da solução de substrato foram adicionados aos poços. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Foram adicionados $100\mu\text{L}$ da solução de parada aos poços e a absorbância foi lida a 450nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). As amostras foram diluídas 1000 vezes para adequação dos níveis à curva-padrão.

4.13. Análise múltipla de citocinas por multiplex

A interferência das vias de produção de citocinas celulares raramente acontece em um ponto específico. De maneira a obter uma análise mais completa dos efeitos dos derivados de imidazopiridinas sobre a rede de citocinas, ensaios como o multiplex são empregados, permitindo a quantificação de diversos analitos em um só experimento. Para tal, foi utilizado o kit HT17MG-14K-PX25, seguindo as recomendações do fabricante.

3×10^5 células U-937 ou macrófagos peritoneais foram semeadas por poço, em placas de 24 poços e tratadas por 24 horas com $1\mu\text{g/mL}$ de LPS, em conjunto ou não com diferentes concentrações dos derivados de imidazopiridinas. Após 24 horas, o sobrenadante dos poços foi coletado, centrifugado para a remoção de debris e armazenado a -20°C . Em uma placa de 96 poços, foram adicionados $200\mu\text{L}$ de tampão de ensaio a todos os poços, incubando a placa por 10 minutos a temperatura ambiente. O conteúdo foi então removido e $25\mu\text{L}$ da curva-padrão foram adicionados aos respectivos poços. Aos demais, foram adicionados $25\mu\text{L}$ de tampão de ensaio. Aos poços referentes à curva-padrão e controles, foram adicionados $25\mu\text{L}$ de meio

RPMI, enquanto aos poços referentes as amostras, foram adicionados 25µL de amostra. 25µL da mistura de *beads* foram adicionados aos poços e a placa foi incubada a 4°C, *overnight*, sob agitação. O conteúdo da placa foi então removido e a placa foi lavada duas vezes com 200µL de tampão de lavagem. Foram adicionados 25µL dos anticorpos de detecção aos poços e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. 25µL da solução de estreptavidina conjugada a ficoeritrina foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi então lavada duas vezes com 200µL da solução de lavagem e os poços ressuspensos em 150µL de tampão de corrida. A placa foi lida utilizando o Bio-plex 200, da Bio-Rad.

4.14. Avaliação do efeito protetivo de imidazopiridinas *in vivo*

Com o objetivo de avaliar o efeito protetivo dos derivados de imidazopiridina, bem como a manutenção de suas propriedades em modelos mais complexos, os testes *in vivo* com camundongos C57BL/6 foram realizados.

Primeiramente, o ensaio de hemólise foi realizado, com sangue venoso humano. 100µL dos compostos foram adicionados a 900µL de sangue e o volume final foi agitado por três segundos e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida, 5mL de PB 1X foram adicionados e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 3000rpm, descartando o sobrenadante. Tal processo repetido quatro vezes no total. Foram adicionados então 4mL de água destilada a fim de liberar a hemoglobina a partir das células intactas. O volume foi então centrifugado e uma parte do sobrenadante foi diluída em quatro partes de água destilada e analisada por espectrofotometria, com absorbância lida a 540nm. Neste comprimento, a absorbância é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina, que por sua vez é proporcional ao número de glóbulos vermelhos intactos que não foram destruídos pelas soluções teste. Como controle negativo, foi utilizado DMSO diluído em PBS 1X na mesma concentração de uso das drogas. Como controle positivo, foi utilizado água destilada contendo 0,1% de Tween-20. Porcentagens de hemólise menores ou iguais a 10 foram consideradas não-hemolíticas.

Para o experimento *in vivo*, camundongos C57BL/6 foram injetados intraperitonealmente com dose letal de LPS (10mg/kg) na presença (10mg/kg) ou ausência dos derivados, bem como apenas com os derivados, com suas taxas de sobrevivência e pesos sendo monitoradas por sete dias. Camundongos não injetados com LPS e injetados apenas com o veículo foram usados como controle.

O Laboratório de Quimioterapia Aplicada trabalha com classes específicas de moléculas e possui registro no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 22199/2014, cobrindo a aplicação de moléculas como imidazopiridinas em modelos animais.

4.15. Análise estatística

As análises estatísticas compreenderam os testes ANOVA, pós-teste de Bonferroni–Dunn e teste t-pareado. Experimentos feitos em triplicata, com valores de p menores do que 0,05 foram considerados significativos. Cálculos e gráficos feitos no programa GraphPad Prism 7, GraphPad Software, Inc.

Os valores da dose letal para 50% das células (DL50) para as células U-937 e macrófagos peritoneais foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT com o tratamento das células por 24h. Para tal, a porcentagem de células viáveis foi plotada contra a dose de tratamento em escala logarítmica. O mesmo procedimento foi feito para o cálculo do IC50 da inibição de TNF- α , usando a porcentagem da produção de TNF- α de células estimuladas com LPS contra a dose de tratamento. Com estes dados, o índice terapêutico dos compostos testados também foi calculado, dividindo o DL50 de cada composto por seu IC50. Os cálculos foram feitos utilizando-se o Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) por regressão não-linear, curva de quatro parâmetros, com interpolação dos dados da curva-padrão. As curvas consideradas apresentaram R² maior ou igual a 0,98.

Para análise da curva de sobrevivência, foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier. O efeito da intervenção é avaliado pela quantidade de indivíduos sobreviventes à intervenção (tratamento) após um período de tempo determinado. O tempo decorrido entre a intervenção e a morte do indivíduo é chamado de tempo de sobrevivência, com a análise dos dados dos diferentes grupos (tratados com veículo,

tratados com LPS, tratados com LPS e compostos 4B ou 4J e tratados apenas com 4B e 4J) determinando as diferenças estatísticas entre suas sobrevivências. Para cada intervalo de tempo (24h), a probabilidade de sobrevivência é calculada pelo número de indivíduos sobreviventes dividido pelo número de pacientes em risco. Os cálculos foram feitos utilizando-se o Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Apenas oito derivados de imidazopiridinas são solúveis

O presente trabalho iniciou a avaliação dos compostos pela sua solubilidade na combinação de solvente orgânico (DMSO) e meio de cultura. Os compostos 4A, 4E e 4H se mostraram insolúveis nestas condições e, portanto, foram descartados. Os experimentos foram iniciados com oito compostos, sendo eles 4B, 4C, 4D, 4F, 4G, 4I, 4J e 4K.

5.2. O tratamento com derivados de imidazopiridinas apresenta atividade inibitória da produção de TNF- α de maneira em células de linhagem celular U-937 e macrófagos peritoneais

Primeiramente foi avaliada a atividade de derivados de imidazopiridina como inibidores de TNF- α , o ensaio de ELISA foi realizado utilizando os oito derivados de imidazopiridinas em células U-937 e macrófagos peritoneais estimulados com LPS. O tratamento deu-se no tempo de 24 horas, com concentrações de 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M e 0,01 μ M aliadas ao tratamento com LPS (Figura 14).

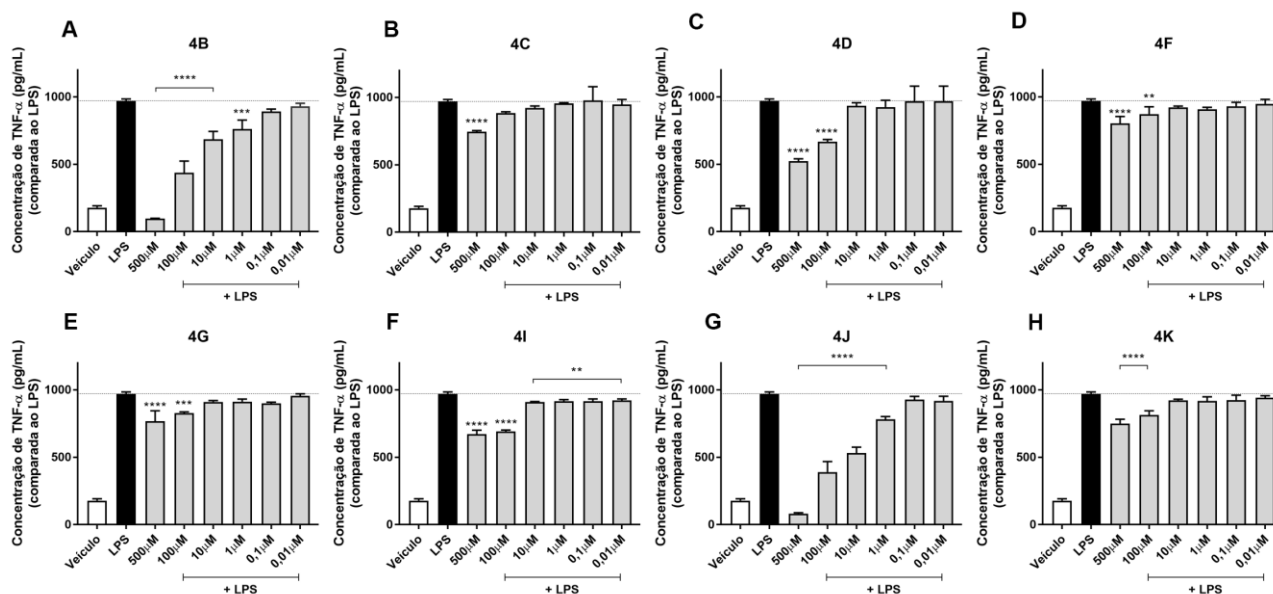


Figura 14. Derivados de imidazopiridinas inibem a produção de TNF- α em células U-937. Células U-937 foram tratadas com LPS e/ou os oito compostos nas concentrações de 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M e 0,01 μ M por 24h e a produção de TNF- α foi determinada por ELISA. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados às células estimuladas com LPS.

Em células de linhagem U-937, na concentração de 500µM, os tratamentos com todos os compostos foram capazes de inibir a produção de TNF-α de maneira significativa quando comparados ao tratamento com LPS. Em especial, o tratamento com os compostos 4B e 4J atingiram marcas de inibição próximas de 90% (89,92% e 91,64%, respectivamente), ao passo que os demais compostos apresentaram inibição menor, como próxima de 50%, ou menor do que 40% (4C, 4F, 4G, 4I e 4K). A redução da dose para 100µM teve padrão semelhantes, nos tratamentos com os compostos 4B e 4J inibindo mais de 50% da produção de TNF-α (54,97% e 59,75%, respectivamente). Nas concentrações de 10µM e 1µM, os únicos compostos a manter a atividade inibitória de TNF-α maior do que 10% foram os compostos 4B e 4J (29,43% e 45,27%; 21,54% e 19,57%, respectivamente), enquanto em concentrações menores, apenas o tratamento com o composto 4I apresentou atividade inibitória de TNF-α, com valores próximos de 5% de inibição (Figura 14F).

Em comparação, macrófagos peritoneais isolados de camundongos C57BL/6 se mostraram mais sensíveis ao tratamento com derivados de imidazopiridinas (Figura 15).

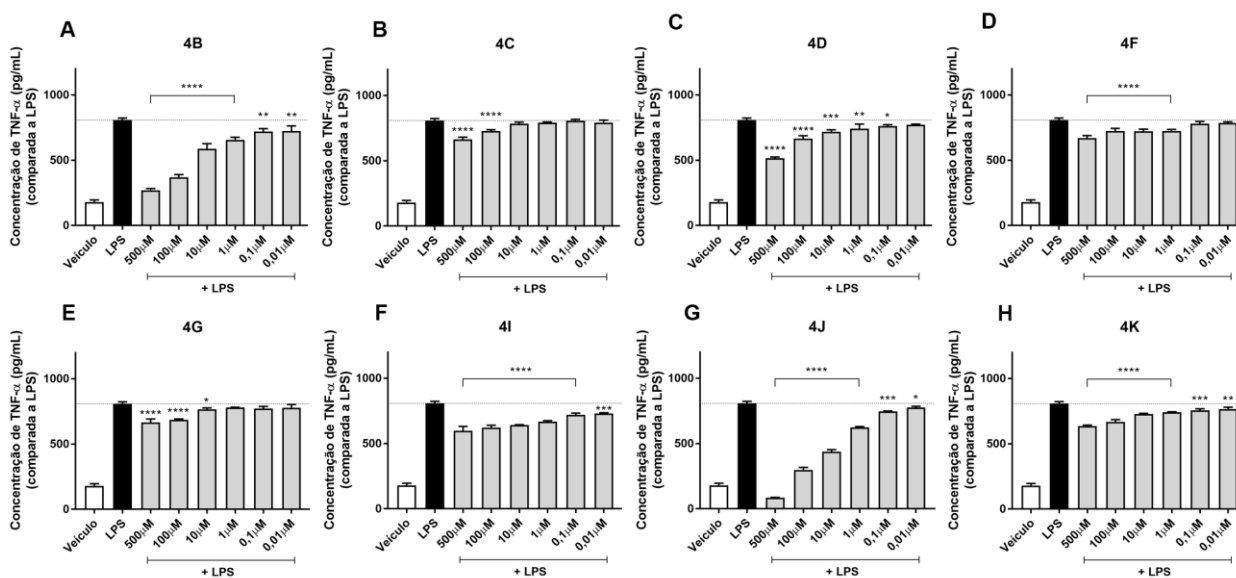


Figura 15. Derivados de imidazopiridinas inibem a produção de TNF-α em macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais foram tratados com LPS e/ou os oito compostos nas concentrações de 500µM, 100µM, 10µM, 1µM, 0,1µM e 0,01µM por 24h e a produção de TNF-α foi determinada por ELISA. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados às células estimuladas com LPS.

Nas concentrações de 500µM e 100µM, todos os compostos mostraram redução significativa nos níveis de TNF-α, com os tratamentos com 4B e 4J se

mostrando como mais eficientes e reduzindo a produção de TNF- α em mais de 50% (66,64% e 89,53%; 54,27% e 63,20%, respectivamente). A 10 μ M, o tratamento com 4C perde a atividade inibitória de TNF- α , padrão mantido em concentrações mais baixas do derivado. Na mesma concentração, o tratamento com o composto 4J é o único composto a manter a taxa de inibição em aproximadamente 50% (45,81%). A 1 μ M, o tratamento com 4G também perde a atividade inibitória, com os demais compostos demonstrando inibição máxima de 22,91%, no tratamento com 4J. A 0,1 μ M e 0,01 μ M, as taxas de inibição não superam 10,95% (4B), com os tratamentos com os compostos 4B e 4J se mostrando os mais eficazes em todas as concentrações testadas.

5.3. O tratamento com derivados de imidazopiridinas induz citotoxicidade em células de linhagem celular U-937 e macrófagos peritoneais

A fim de avaliar a presença ou não de atividade citotóxica dos oito compostos com núcleos de imidazopiridina, o ensaio de MTT foi realizado utilizando células da linhagem U-937 e macrófagos peritoneais. O tratamento deu-se no tempo de 24 horas, com concentrações de 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M e 0,1 μ M (Figuras 16 e 17). Pela baixa eficiência de inibição da produção de TNF- α pelos tratamentos a 0,01 μ M com os compostos supracitados, tal concentração foi desconsiderada nos ensaios de viabilidade celular.

Em células de linhagem U-937, na concentração de 500 μ M, o tratamento com todos os compostos, com exceção do composto 4C, apresentaram citotoxicidade. Nos tratamentos com os compostos 4B, 4D, 4F e 4J, o resultado foi superior a 50% de perda de viabilidade (85,87%, 68,82%, 70,69% e 85,41%, respectivamente), ao passo que o tratamento com o composto 4I se aproximou de 50% de perda de viabilidade (47,86%) e uso dos compostos 4G e 4K manteve a viabilidade celular próxima de 90% (93,67% e 93,3%, respectivamente). A redução da dose para 100 μ M teve resultados semelhantes, com a diferença de que nos tratamentos com 4G e 4K, não houve redução da viabilidade celular. Nas concentrações de 10 μ M, 1 μ M e 0,1 μ M, o tratamento com nenhum dos compostos levou à grande redução da viabilidade celular. Os únicos tratamentos com redução significativa (aproximadamente 10%) foram os

tratamentos com os compostos 4I e 4J, com valores próximos de 7% de redução da viabilidade celular na concentração de 0,1µM (6,54% e 7,34% respectivamente).

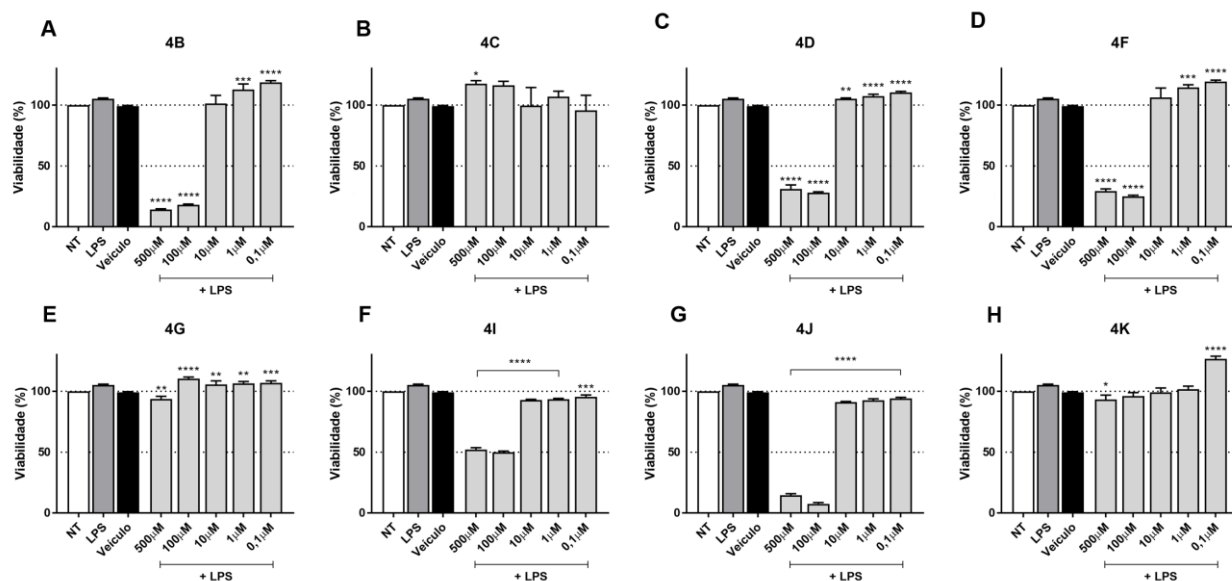


Figura 16. Efeito dos derivados de imidazopiridina na viabilidade celular de células U-937. As células U-937 foram tratadas com LPS e/ou os oito compostos nas concentrações de 500µM, 100µM, 10µM, 1µM e 0,1µM por 24h e a viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados ao controle não tratado.

De maneira similar ao ocorrido nos ensaios de inibição da produção de TNF-α, macrófagos peritoneais se mostraram mais sensíveis ao tratamento com derivados de imidazopiridinas (Figura 17).

Assim como na linhagem celular U-937, na concentração de 500µM, o tratamento com todos os compostos, com exceção de 4C, levaram à redução na viabilidade celular. Além disso, o percentual das reduções foi superior, de modo que, além do tratamento com 4B, 4D, 4F e 4J (98,69%, 88,45%, 74,95% e 87,3%, respectivamente), o tratamento com o composto 4I também levou à redução de mais de 50% na viabilidade celular (58,23%). Na concentração de 100µM, o padrão observado anteriormente (concentração de 500µM) foi praticamente mantido, com redução aproximada de 10% na perda de viabilidade celular. De maneira diferente de células U-937, a concentração de 10µM apresentou citotoxicidade relevante em macrófagos peritoneais. Apenas o tratamento com o composto 4C não induziu a perda de viabilidade celular nessa concentração, com o tratamento com o composto 4D mostrando a maior redução na viabilidade celular (50,02%). O uso da concentração de 1µM também manteve o mesmo padrão, mas com as perdas na viabilidade celular

variando entre 10 e 30%. A menor das concentrações de tratamento, 0,1 μ M, reduziu a viabilidade celular apenas no tratamento com os compostos 4F e 4J (10,92% e 17,09%, respectivamente).

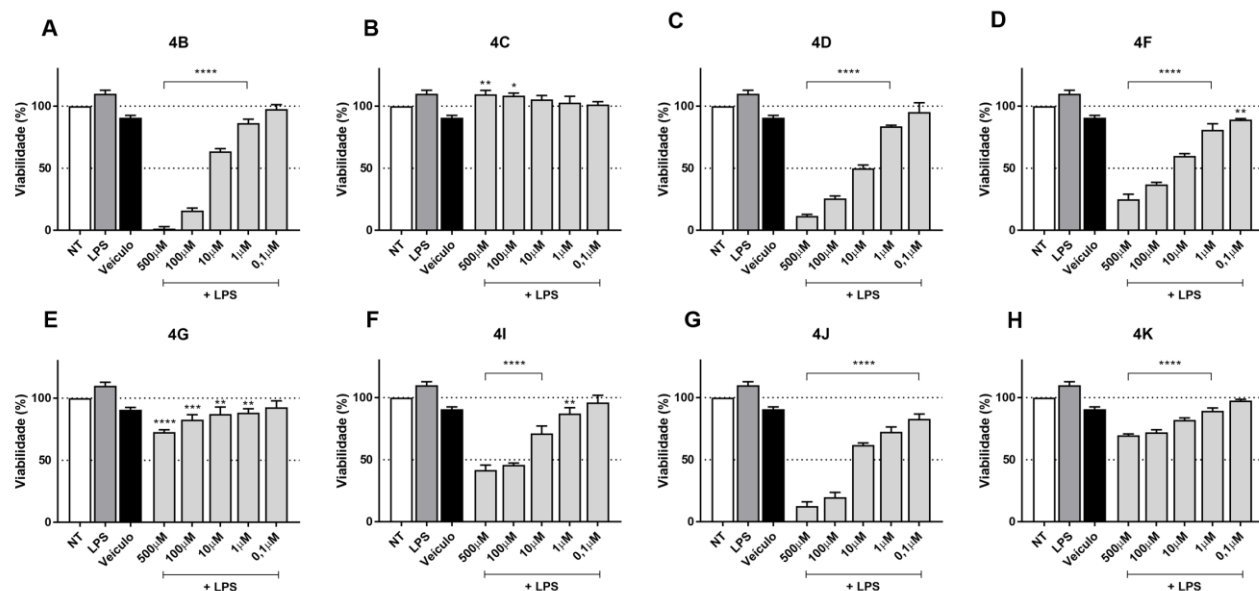


Figura 17. Efeito dos derivados de imidazopiridina na viabilidade celular de macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais foram tratados com LPS e/ou os oito compostos nas concentrações de 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M e 0,1 μ M por 24h e a viabilidade foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

5.4. Os derivados 4B e 4J apresentam os melhores índices terapêuticos em células U-937

As doses letais para 50% das células (DL50) dos compostos foram calculadas com base no tratamento das células U-937 e macrófagos peritoneais por 24h. Alguns compostos não demonstraram efeitos citotóxicos o suficiente para o cálculo da DL50, portanto possuem valor de DL50 indeterminado. Todos os compostos testados apresentaram DL50 menor em macrófagos peritoneais do que em células U-937.

As concentrações inibitórias de 50% da produção de TNF- α (IC50) dos compostos foram calculadas com base no tratamento das células U-937 e macrófagos peritoneais por 24h. Alguns compostos não demonstraram efeitos inibitórios o suficiente para o cálculo do IC50, portanto possuem valor de IC50 indeterminado. Os únicos compostos com IC50 calculável em ambos tipos celulares foram os compostos 4B e 4J, com IC50 de 22,61 μ M e 13,67 μ M, respectivamente, em células U-937 e 90,10 μ M e 11,57 μ M em macrófagos peritoneais.

Os valores de índice terapêutico calculados para os compostos em ambas as linhagens, juntamente com os valores de DL50 e IC50 são apresentados na Tabela 1. Apenas no modelo de células U-937 o índice terapêutico se mostrou positivo, com valores de 2,00 para o tratamento com o composto 4B e 1,53 para o tratamento com o composto 4J.

A

U-937			
COMPOSTO	DL50 (μM)	IC50 (μM)	IT
4B	45,28 \pm 5,24	22,61 \pm 1,98	2,00
4C	---	---	---
4D	101,58 \pm 8,72	12564,26 \pm 112,11	0,01
4F	85,13 \pm 8,75	---	---
4G	---	---	---
4I	802,13 \pm 137,37	477734,5 \pm 299,8	0,00
4J	20,95 \pm 1,07	13,67 \pm 1,43	1,53
4K	---	---	---

B

MAC. PERITONEAIS			
COMPOSTO	DL50 (μM)	IC50 (μM)	IT
4B	12,35 \pm 2,03	90,1 \pm 13,7	0,14
4C	---	---	---
4D	11,34 \pm 2,00	---	---
4F	27,26 \pm 7,69	---	---
4G	---	---	---
4I	141,75 \pm 49,27	---	---
4J	9,31 \pm 2,83	11,57 \pm 2,88	0,80
4K	---	---	---

Tabela 1. DL50, IC50 e índice terapêutico (IT) estabelecidos para os oito compostos testados. Os valores foram calculados com base no tratamento de 24h de células U-937 (A) e macrófagos peritoneais (B).

5.5. O tratamento com o derivado de imidazopiridina 4B impede a translocação de NFkB para o núcleo de células U-937

A produção de TNF- α em células do sistema imunológico é majoritariamente controlada pelo fator de transcrição NFkB. Nossos resultados sugerem que há expressão constitutiva de NFkB na linhagem células U-937, com marcação majoritariamente citoplasmática, como demonstrado pelas imagens de microscopia confocal de células não-tratadas (Figura 18A). A ativação de células U-937 com LPS induz a translocação de NFkB para o interior do núcleo (Figura 18B). O tratamento com o composto 4B impede a translocação de NFkB induzida por LPS, demonstrando perfil semelhante ao de células não tratadas (Figura 18C). Curiosamente, o composto 4J, que também inibe a produção de TNF- α , tem perfil de expressão de NFkB semelhante ao de células tratadas apenas com LPS, com NFkB intranuclear (Figura 18D). As imagens de seção ortogonal comprovam as localizações supramencionadas de NFkB.

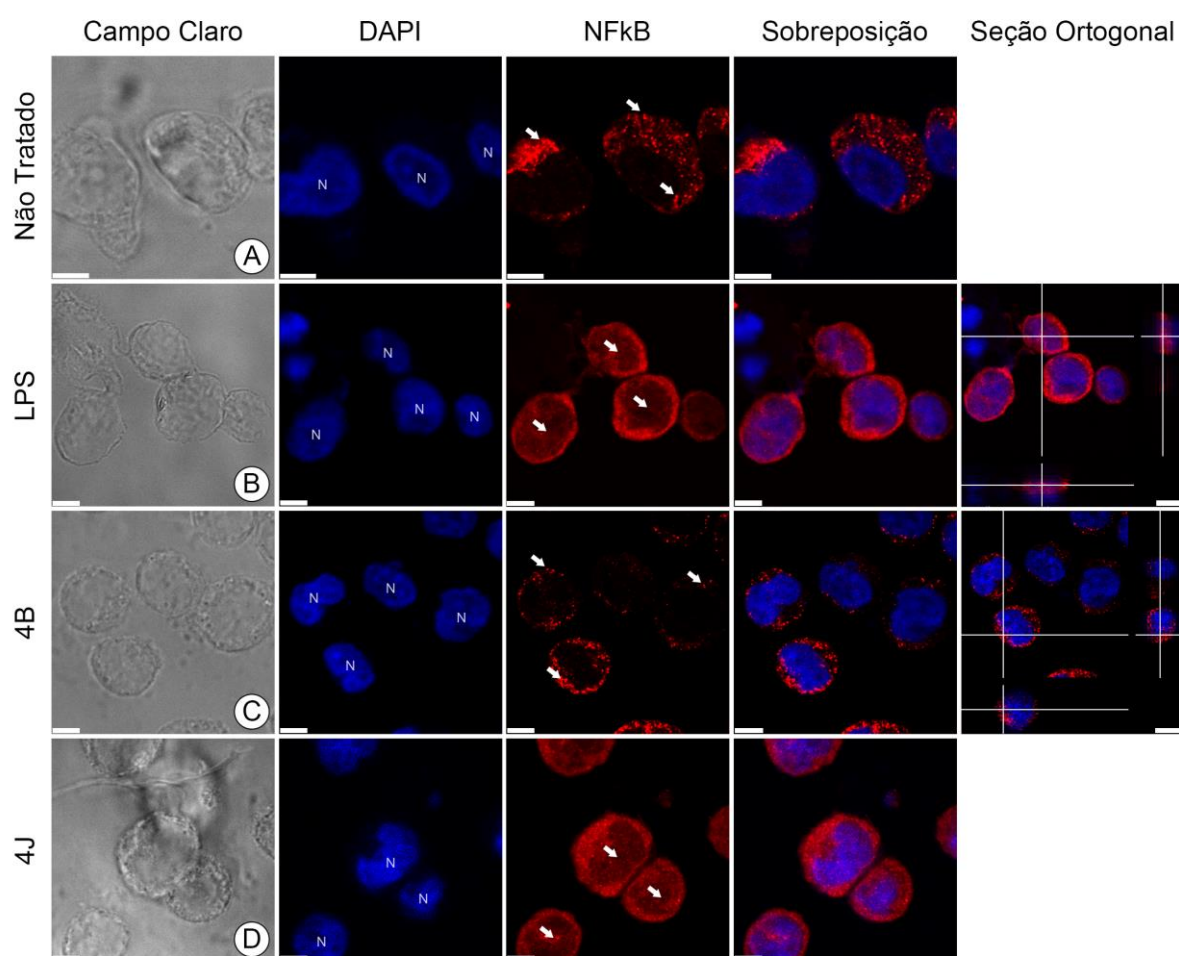


Figura 18. Diferentes perfis de localização de NFκB são induzidos por derivados de imidazopiridinas em células U-937. Após tratamento com LPS (1μg/mL), células U-937 foram tratadas com as concentrações de IC50 dos compostos 4B (22,61μM) e 4J (13,67μM) por 24 horas. As células foram marcadas com anticorpo anti-NFκB (em vermelho) e observadas em microscópio confocal, com aumento de 63X. Núcleos marcados com DAPI (em azul). Barra de referência: 5 μm.

5.6. O impedimento da translocação de NFκB para o núcleo de células U-937 é mediado pela inibição da fosforilação de IκB-α e p38 MAPK

A fosforilação de IκB-α e sua subsequente degradação é um fator crucial para a translocação de NFκB para o interior do núcleo da célula. Em células U-937 estimuladas com LPS, nota-se um aumento da quantidade de IκB-α fosforilada (2,1 vezes) quando comparada às células não tratadas. O tratamento com o composto 4B diminui os níveis de IκB-α fosforilada em células U-937 em comparação às células estimuladas somente com LPS (redução de 28,04%) (Figura 19B e 19D).

A ativação da proteína p38 MAPK também é importante na produção de TNF- α por células do sistema imunológico. Em células U-937 tratadas com LPS, nota-se um aumento na expressão de p39 MAPK (1,7 vezes) quando comparado às células não tratadas. O uso de 4B reduz a expressão de p38 MAPK em células U-937 tratadas com este composto em comparação às células estimuladas somente com LPS (redução de 16,19%) (Figura 19C e 19E).

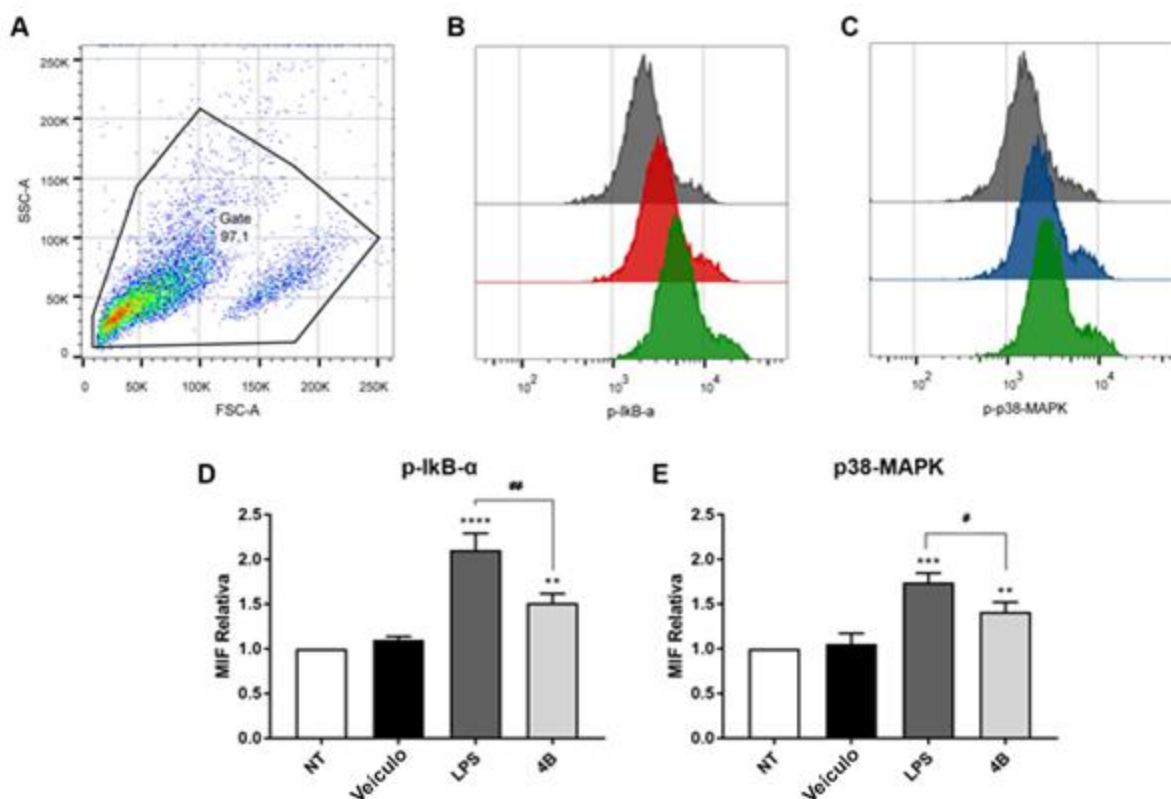


Figura 19. A inibição da fosforilação de I κ B- α e p38-MAPK é induzida pelo tratamento com o composto 4B em células U-937. Células U-937 (A) tratadas com a concentração de IC₅₀ do composto 4B mostram redução da fosforilação de I κ B- α (B e D; células não-tratadas (cinza), células tratadas com LPS (verde), células tratadas com LPS e com o composto 4B (vermelho)), redução da fosforilação de p38-MAPK (C e E; células não-tratadas (cinza), células tratadas com LPS (verde), células tratadas com LPS e com o composto 4B (azul)). Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados ao controle não tratado. #P<0.05 e ##P<0.01 comparados ao tratamento com LPS. As imagens são representativas da triplicata de experimentos.

5.7. O tratamento com o composto 4J eleva os níveis de cAMP em células U-937, contrapondo a ativação com LPS

A regulação dos níveis de cAMP intracelular está intimamente relacionada com a produção de citocinas. De maneira geral, elevações nos níveis de cAMP levam à inibição da produção de TNF- α . Com o objetivo de avaliar a modulação dos níveis de cAMP em células U-937 tratadas com os compostos 4B e 4J, um ensaio de imunocompetição foi realizado. Em células U-937, o estímulo com LPS, reduziu os níveis de cAMP quando comparado às células não tratadas, com uma produção de 29,65pmol/mL. O tratamento com veículo (DMSO) levou também à redução em cAMP (38,95pmol/mL). O tratamento com o composto 4B não produziu alterações significativas nos níveis de cAMP quando comparada às células não tratadas ou quando comparado ao tratamento com LPS. O tratamento com o composto 4J, por sua vez, elevou os níveis de cAMP intracelular à marca de 90pmol/mL, significativa quando comparado às células não tratadas e ao tratamento com LPS (Figura 20).

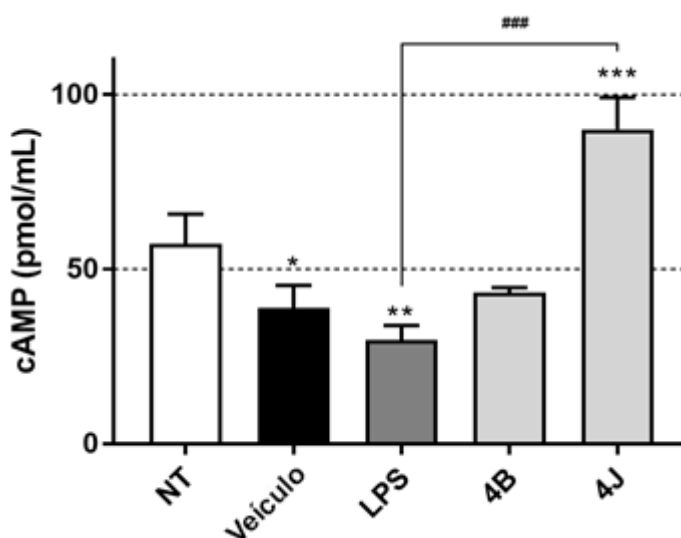


Figura 20. A aplicação do composto 4J em células U-937 eleva os níveis de cAMP. Células U-937 foram analisadas quanto aos níveis de cAMP após tratamentos com LPS (1 μ g/mL), e/ou o IC50 dos compostos 4B (22,61 μ M) e 4J (13,67 μ M) por 24h e os níveis de cAMP foram determinados por ensaio de imunocompetição. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados às células não tratadas. ###P<0,001 comparados às células tratadas com LPS.

5.8. O tratamento com os compostos 4B e 4J alteram os níveis de NO em células U-937

Óxido nítrico é um importante regulador de funções celulares, inclusive da produção de cAMP em células do sistema imunológico. Altos níveis de NO levam à redução dos níveis de cAMP. Com o objetivo de avaliar a modulação dos níveis de NO em células U-937 tratadas com os compostos 4B e 4J, o ensaio de Griess foi utilizado. Em células U-937, o estímulo com LPS, elevou a produção de NO em 7,4 vezes (68,13 μ M) quando comparado às células não tratadas (9,19 μ M). O composto 4B elevou a produção de NO quando comparado às células não tratadas (54,92 μ M), mas reduziu a produção de NO quando comparado ao tratamento com LPS. O composto 4J, por sua vez, elevou os níveis de NO quando comparado às células não tratadas, mas apenas em 1,96 vezes (18,05 μ M). Quando comparado ao tratamento somente com LPS, houve redução de 3,77 vezes (Figura 21).

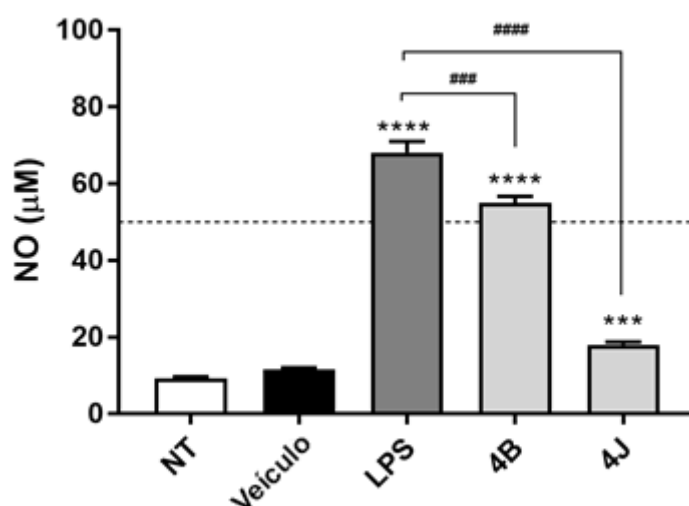


Figura 21. O estímulo com LPS e o tratamento com os compostos 4B e 4J elevam os níveis de NO em células U-937. Células U-937 foram analisadas quanto aos níveis de cAMP após tratamentos com LPS (1 μ g/mL), e/ou o IC50 dos compostos 4B (22,61 μ M) e 4J (13,67 μ M) por 24h e os níveis de NO foram determinados pelo ensaio de Griess. Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados às células não tratadas. #P<0.05, ##P<0.01 e ###P<0.001 comparados às células tratadas com LPS.

5.9. O tratamento com os compostos 4B e 4J modula a produção de outras citocinas que não TNF- α

A orquestração da resposta imune inflamatória é fator essencial na progressão da resposta e resolução da inflamação a fim de restaurar o funcionamento normal dos tecidos. De forma a avaliar uma quantidade maior de citocinas quanto aos efeitos em sua produção pelo tratamento com os compostos 4B e 4J, foi realizado ensaio de Multiplex, com análise de diversas citocinas (Figura 22).

A análise da produção de TNF- α por Multiplex reiterou os resultados anteriores, nos quais o tratamento com os compostos 4B e 4J levaram à inibição da produção de TNF- α quando comparados ao tratamento com LPS (Figura 22A), em proporções semelhantes as encontradas nos ensaios de ELISA (redução de 34,28% para 4B e 59,91% para 4J). Os resultados referentes à produção de IL-6 mostram padrão semelhante aos resultados com TNF- α , com redução da produção de IL-6 no tratamento com os compostos 4B (53,65%) e 4J (51,78%).

A produção das citocinas IFN- γ , IL-12p70 e CCL20/MIP3 α , também sofreu redução no tratamento com o composto 4B, com valores de redução de 69,74%, 62,04% e 52,85%, respectivamente. O tratamento com o composto 4B, além da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, induziu a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-13, IL-15, IL-22 e IL-33, com aumentos nos valores de 96,81%, 85,83%, 120,32%, 27,37% e 58,95%, respectivamente.

5.10. O tratamento de camundongos C57BL/6 com os compostos 4B e 4J possui efeito protetivo no modelo *in vivo* de sepse

A fim de investigar o possível efeito protetivo da aplicação *in vivo* dos compostos 4B e 4J, os compostos foram aplicados no modelo experimental murino de sepse. A partir da constatação de que o uso dos compostos não é capaz de causar a hemólise de glóbulos vermelhos (6,59% para 4B e 9,28% para 4J), o efeito dos compostos foi acompanhado por 8 dias com análise dos padrões de peso (Figuras 23B e 23C) e sobrevivência dos camundongos (Figura 23A).

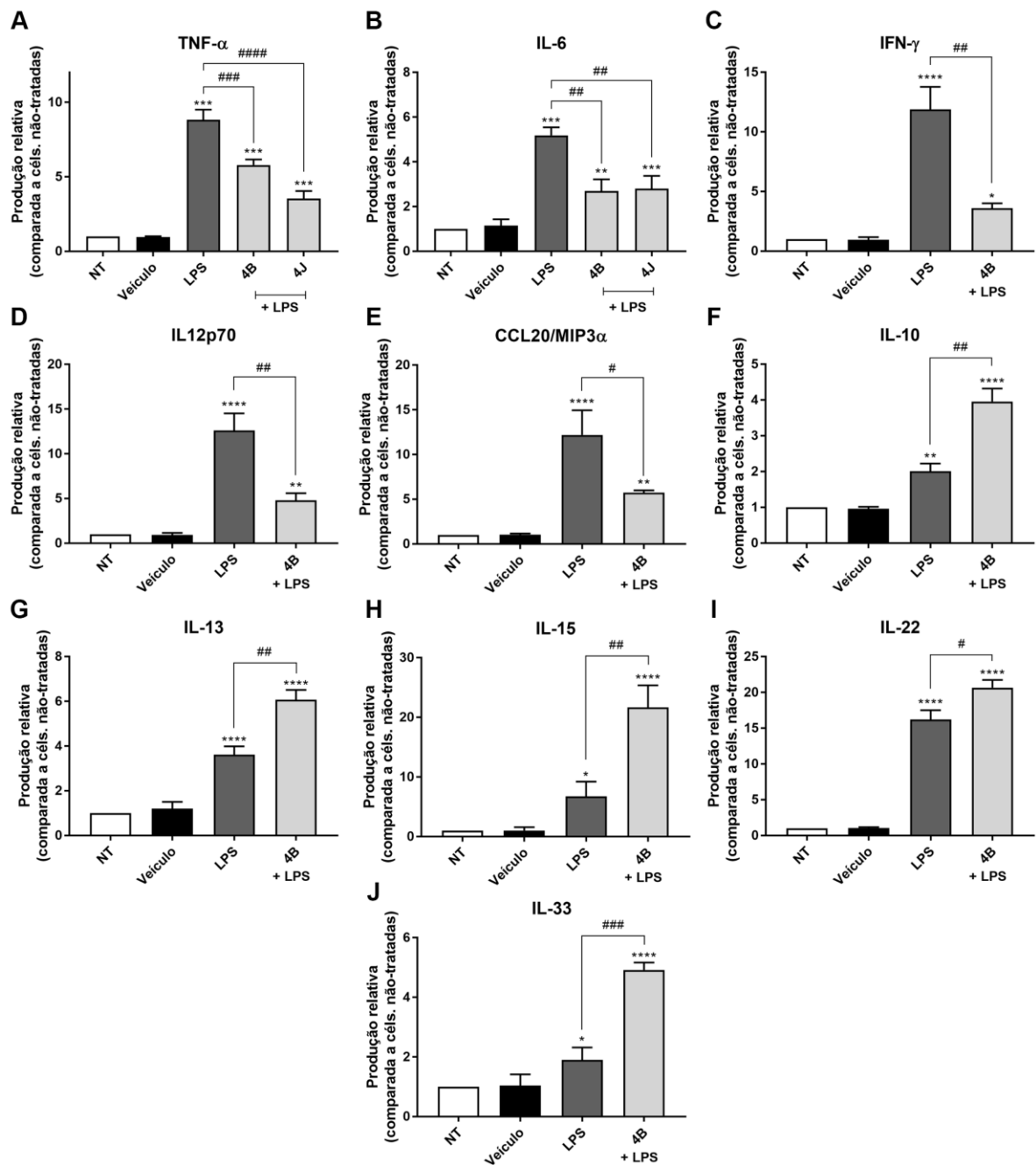


Figura 22. O tratamento de células U-937 com os derivados de imidazopiridinas 4B e 4J também interfere na produção de outras citocinas que não TNF- α . Após 24h de tratamento, os sobrenadantes foram analisados por Multiplex para quantificação da produção das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), IL-12p70 (D), CCL20/MIP3 α (E), IL-10 (F), IL-13 (G), IL-15 (H), IL-22 (I) e IL-33 (J). Os dados representam a média \pm SD de três experimentos independentes em triplicata. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparados às células não tratadas. #P<0.05, ##P<0.01 e ###P<0.001 comparados às células tratadas com LPS.

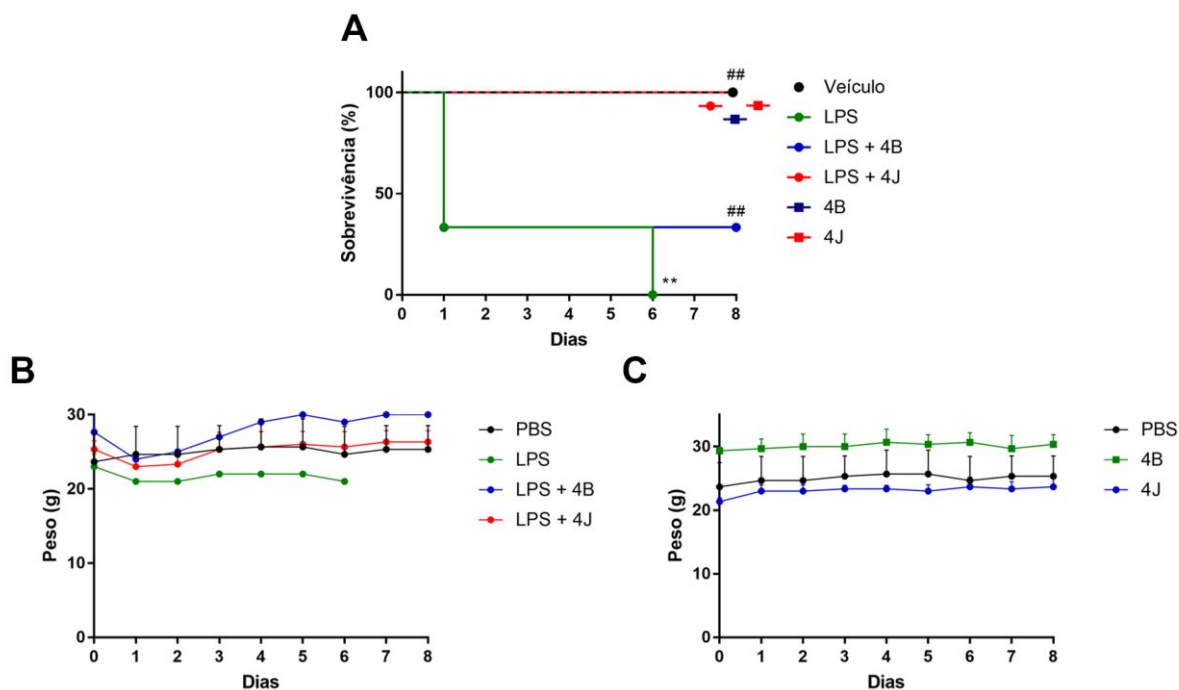


Figura 23. O tratamento com os compostos 4B e 4J tem efeito protetivo sobre o tratamento com dose letal de LPS, no modelo de sepse murino. Camundongos C57Bl/6 foram injetados peritonealmente com 10mg/kg dos compostos 4B ou 4J 15 minutos antes da injeção peritoneal de 10mg/kg de LPS. Sobrevivência (A) e peso corpóreo (B e C) foram analisados durante 8 dias após os tratamentos, com intervalos de 24h. n= 3 animais para cada grupo. **P<0.01 comparado às células não tratadas. ##P<0.01 comparado às células tratadas com LPS.

O tratamento de camundongos C57BL/6 apenas com os compostos 4B e 4J, sem administração de LPS, demonstram que os compostos não são capazes de levar à morte dos indivíduos no tempo testado, ao passo que o tratamento apenas com LPS, sem o uso dos compostos, levou à morte de dois indivíduos com 24h da aplicação, com a morte do indivíduo restante no dia 6. O tratamento com o composto 4B aliado à administração de LPS levou à morte de dois indivíduos com 24 horas da aplicação, com o último indivíduo sobrevivendo durante todo o período do experimento, indicando aumento da sobrevivência do animal em questão. Em comparação, o tratamento com o composto 4J aliado à administração de LPS preveniu a morte dos indivíduos, que sobreviveram durante todo o período do experimento. A aplicação do veículo utilizado para diluição das drogas não causou alteração na sobrevivência dos animais, com os três indivíduos sobrevivendo durante todo o período do experimento.

Em relação às diferenças no peso corpóreo dos animais utilizados no experimento, nenhuma das aplicações causou alteração significativa no peso dos animais. Os resultados mostram uma perda inicial de 1 a 2 gramas nos animais injetados com LPS (junto ou não do tratamento com os compostos), porém com rápida recuperação (3 a 4 dias).

6. DISCUSSÃO

6.1. A ação inibitória de derivados de imidazopiridina na produção de TNF- α

O tratamento de doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite, psoríase, doença inflamatória do intestino e sepse) tem avançado significativamente nas últimas décadas, principalmente pela utilização de terapias imunes biológicas e, especialmente, pela inibição do fator de necrose tumoral (TNF- α) (PRADO, 2017). TNF- α é uma citocina envolvida na regulação de diversos processos celulares importantes, como proliferação, diferenciação, crescimento e resposta imune (HAYASHI, et al., 2013). TNF- α é considerada uma das citocinas mais importantes na modulação do processo inflamatório, e sua rápida indução é fundamental para a orquestração da resposta imune, tendo papel importante na patogênese de diversas doenças (HUBER, 2017). Dessa forma, a inibição de TNF- α abre um campo de possibilidades de tratamento ainda não globalmente disponível a pacientes. As terapias atuais são compostas majoritariamente de anticorpos monoclonais anti-TNF- α que, apesar dos bons resultados iniciais, não possuem bons índices de rendimento clínico, com uma grande proporção de pacientes não-respondentes ao tratamento (BENDTZEN, 2013; MALVIYA, 2013). Além do alto custo de produção, como proteínas exógenas, estes agentes anti-TNF- α frequentemente induzem a formação de antígenos anti-droga, responsáveis pela redução dos níveis séricos destes agentes e pela indução de diversos efeitos adversos (ATZENI, 2013). Como uma alternativa mais prática, viável e com menos efeitos adversos, a prospecção de pequenas moléculas com ação anti-inflamatória por inibição de TNF- α se torna assunto interessante de pesquisa e para desenvolvimento de novos fármacos. De fato, a literatura recente vem descrevendo diversas ações de derivados de imidazopiridinas com diferentes propriedades, como inibição da inflamação e estresse oxidativo em lesões cardíacas associadas à obesidade (QIAN, 2016), antitumoral em câncer de próstata (INGERSOLL, 2015), antibacteriana (JOSE, 2015; CHENG, 2014), inibição de colesterol hidrolase em pacientes com desordens neurodegenerativas (UTO, 2015), antiviral (FENG, 2015) e inibição da produção de TNF- α (LACERDA, 2014; CHEN, 2013).

O presente trabalho tratou de avaliar, de forma preliminar, a possível atividade anti-inflamatória de oito compostos derivados de imidazopiridinas (IMPs) em células

de linhagem U-937 diferenciadas com PMA, macrófagos peritoneais isolados de camundongos C57BL/6 e, pontualmente, *in vivo*.

Oito diferentes derivados de imidazopiridinas previamente sintetizados pelo Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília e nomeados 4B, 4C, 4D, 4F, 4G, 4I, 4J e 4K iniciaram sua avaliação pela inibição de TNF- α foi verificada pelo método de ELISA, em ambos os tipos celulares, utilizando concentrações de 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M e 0,01 μ M. Na concentração de 500 μ M, o tratamento com todos os compostos inibiu a produção de TNF- α em células U-937, com o uso dos compostos 4B e 4J demonstrando taxas consideráveis de inibição, de 89,92% e 91,64%, respectivamente. A redução da concentração para 100 μ M resultou na perda de atividade inibitória do composto 4C. Condizente com os melhores resultados em altas concentrações, o tratamento com os compostos 4B e 4J manteve sua atividade nas baixas concentrações de 10 μ M e 1 μ M, perdendo sua atividade apenas com a redução da concentração para 0,1 μ M e 0,01 μ M (Figura 14).

Outros estudos envolvendo compostos desenvolvidos com base em núcleos de imidazopiridinas mostram IC₅₀ variáveis, geralmente entre 1 μ M e 15 μ M (CHEN et al., 2013; RETHER et al., 2008), ressaltando o fato de que modificações nas estruturas moleculares dos compostos aqui testados podem reduzir a concentração necessária para a inibição de 50% da produção de TNF- α .

A utilização dos compostos em macrófagos peritoneais demonstrou maior sensibilidade dos mesmos ao tratamento, com mais compostos mantendo a atividade inibitória em menores concentrações, mesmo que com eficiência menor na redução dos níveis de TNF- α quando comparado às células U-937. A concentração de 500 μ M novamente produziu com sucesso a inibição de TNF- α no tratamento com todos os compostos utilizados, em especial com o uso dos compostos 4B e 4J, com inibição de 66,64% e 89,53%, respectivamente. Na concentração de 100 μ M, nenhum composto perdeu a atividade inibitória e, novamente os tratamentos com os compostos 4B e 4J inibiram a produção de TNF- α de forma considerável, com inibição de 54,27% e 63,20%, respectivamente. A 10 μ M, o tratamento com 4C perde sua atividade inibitória, com o tratamento com 4J sendo o único a manter atividade considerável, com 45,81% de inibição. A 1 μ M, o tratamento com 4G também perde a atividade inibitória, com os

demais compostos demonstrando inibição máxima de 22,91%, no tratamento com 4J. A 0,1 μ M e 0,01 μ M, as taxas de inibição não superam 10,95% (4B). (Figura 15).

Em comparação à literatura disponível, apenas um estudo analisou a eficiência de compostos desenvolvidos com base em núcleos de imidazopiridinas em macrófagos peritoneais, demonstrando IC50 entre 0,2 μ M e 1 μ M (LACERDA et al., 2014).

Com o objetivo futuro de utilização destes compostos como fármacos atuantes em células do sistema do sistema imunológico, diferente dos compostos geralmente testados pelo nosso grupo, a indução de citotoxicidade é uma característica indesejável, sendo esperado que os compostos não interfiram na viabilidade celular, ou que a interferência seja a mínima possível. Os ensaios de viabilidade celular realizados (Figura 16) demonstraram que, em altas concentrações (500 μ M e 100 μ M), virtualmente todos os tratamentos com os derivados de imidazopiridinas causavam perda considerável da viabilidade celular de células U-937. O tratamento com três compostos (4C, 4G e 4K) foram exceções, demonstrando pouca ou nenhuma perda de viabilidade celular. Tratamentos em concentrações mais baixas (10 μ M, 1 μ M e 0,1 μ M) demonstraram toxicidade máxima de 7,34% do composto 4J. De maneira a estender a aplicação dos IMPs a um modelo mais próximo de sua futura aplicação, o mesmo ensaio de viabilidade celular foi realizado com macrófagos peritoneais isolados de camundongos C57BL/6.

CHENT et al., 2013 também relatou diminuição da viabilidade celular de células tratadas com derivados de imidazopiridinas, encontrando valores de DL50 próximos de 20 μ M.

Devido às diferenças inerentes de células de linhagem para células de cultura primária, os resultados tiveram diferenças significativas. Macrófagos peritoneais se demonstram mais sensíveis ao tratamento com os IMPs. A indução de índices consideráveis de perda da viabilidade celular se estendeu às concentrações mais baixas, sendo pronunciado nas concentrações de 500 μ M, 100 μ M e 10 μ M para o tratamento com todos os compostos, com exceção de 4C que não levou à redução da viabilidade celular em nenhuma concentração (Figura 17). Em comparação com a concentração de 1 μ M em células U-937 - na qual o tratamento com apenas dois compostos induziu pequena redução de viabilidade celular - em macrófagos

peritoneais a aplicação dos compostos 4B, 4D, 4F, 4G, 4I, 4J e 4K resultou em perda de viabilidade, sendo que o tratamento com o composto 4J apresentando uma toxicidade máxima de 27,45%. A concentração de 0,1 μ M resultou em pequena redução na viabilidade celular no tratamento com os compostos 4F e 4J, com toxicidade máxima de 17,09%. De maneira geral, células de linhagens celulares de fato são mais resistentes à morte celular do que células de cultura primária que tendem a ser mais sensíveis às perturbações induzidas por fármacos. Não obstante, pela pequena redução da viabilidade celular observada na utilização destes compostos em células U-937, foi dado prosseguimento aos experimentos de validação de IMPs, a fim de avaliar sua atividade intracelular. As concentrações para uso experimental *in vitro* dependem, também, das concentrações de uso destas moléculas, determinadas pelo ensaio de inibição de TNF- α .

Nos relatos de LACERDA et al., 2014, compostos derivados de imidazopiridinas foram testados em macrófagos peritoneais, com valores de DL50 variando entre 6,9 μ M e 23,5 μ M.

A concentração inibitória de 50% (IC50) da produção de TNF- α foi utilizada, então, como parâmetro para a definição de quais compostos possuíam melhor atividade tanto em células U-937 quanto em macrófagos peritoneais. Devido à perda de atividade de alguns compostos durante a redução das concentrações, não foi possível calcular o IC50 dos oito derivados. Foram identificados dois compostos com as menores IC50 para ambos tipos celulares, sendo estes os compostos 4B e 4J. Em células U-937, 4B teve IC50 calculado de 22,61 μ M, ao passo que 4J teve IC50 calculado de 13,67 μ M. Em macrófagos peritoneais, a IC50 de 4B elevou-se para 90,1 μ M, enquanto a IC50 de 4J foi reduzida para 11,57 μ M.

A fim de relacionar a atividade inibitórias dos compostos supracitados com sua capacidade de indução de citotoxicidade, a IC50 de cada um dos compostos foi comparada com sua DL50 (calculada a partir dos ensaios de viabilidade). No caso de células U-937, 4B e 4J apresentaram DL50 de 45,28 μ M e 20,95 μ M, respectivamente, ambas concentrações maiores do que as necessárias para inibir 50% da produção de TNF- α . O índice terapêutico dos compostos 4B e 4J em células U-937 foi calculado com valores de 2,00 e 1,53 respectivamente, sendo os melhores resultados do presente estudo. Em contraste, no caso de macrófagos peritoneais, 4B e 4J

apresentaram DL50 de 12,35 μ M e 9,32 μ M, valores menores ou bastante próximos às concentrações de inibição de 50% da produção de TNF- α . Com base nestes resultados, os experimentos seguintes foram realizados utilizando apenas a linhagem de células U-937, com tratamentos de mesma concentração do IC50 calculado para cada um dos compostos. Estudos prévios com derivados de imidazopiridinas encontram índices terapêuticos bastante variáveis, entre 2,8 e 103,3 (LACERDA et al., 2014). A necessidade de modificações no desenho e síntese das moléculas aqui retratadas fica, mais uma vez, ressaltada, a fim de obter valores maiores dos índices terapêuticos citados.

Uma vez atestada a eficácia dos compostos 4B e 4J na inibição da produção de TNF- α e suas baixas alterações na viabilidade celular de células U-937, o estudo se voltou para a elucidação de quais vias e mecanismos intracelulares eram modulados pela aplicação destes compostos nas concentrações supracitadas.

6.2. A regulação da via clássica de NF κ B pelo composto 4B

Como regulador chave da produção de TNF- α por monócitos e macrófagos, a primeira via a ser analisada foi a via de NF κ B. NF κ B é um fator de transcrição essencial para a transcrição do mRNA de TNF- α após estimulação das células com LPS (AKIRA, 2004), um ligante de TLR4 que desencadeia a resposta inflamatória por diversas vias de sinalização e está intimamente envolvido com patologias como a sepse (CASTELLHEIM, 2009; CAVAILLON, 2005). Uma vez ativado, TLR4 recruta diversas proteínas adaptadoras que são acopladas a quinases e levam à ativação de diversos fatores de transcrição, entre eles, o NF κ B (O'NEILL, 2007) (Figura 2). Constitutivamente, NF κ B reside no citoplasma, em sua forma inativa, fisicamente associado a I κ B. A partir do estímulo inflamatório, I κ B é fosforilada e degradada, permitindo a translocação de NF κ B para o núcleo (NAPETSCHNIG, 2013). Uma vez no núcleo, NF κ B induz a transcrição de diversos genes. A transcrição do mRNA de TNF- α , por exemplo, é induzida e controlada pelo NF κ B (MERIKA, 2001; DONG, 2007). A inibição da atividade de NF κ B, por exemplo, pode ser regulada por I κ B-quinase leva a à inibição da transcrição de TNF- α induzida por LPS (LIM, 2007). Uma das outras vias resultantes da ativação de TLR4 envolve MAPKs, como p38. As vias de MAPK são complexas e interconectadas e podem cooperar com outras vias de

sinalização induzidas por ligantes (ROUX, 2004). Torna-se assim, interessante desvendar se os compostos 4B e 4J atuam em alguma destas vias e, portanto, são capazes de inibir a produção de TNF- α e células U-937.

A análise de células U-937 tratadas com LPS e/ou os compostos 4B e 4J por microscopia confocal fornece evidências para o papel na modulação de NF κ B por estes compostos (Figura 18). O ensaio de imunodeteção demonstrou que a ativação de NF κ B por LPS induz sua translocação para o interior do núcleo, conforme esperado. Um perfil oposto (semelhante ao de células não tratadas) foi induzido pelo tratamento com 4B, indicando uma ação inibitória na via de ativação de NF κ B, sem redução de sua expressão. Embora o tratamento com 4J também resulte na inibição da produção de TNF- α , o ensaio de imunodeteção sugere que tal inibição não seja decorrente da modulação da via de TLR4/NF κ B, visto que o perfil de localização de NF κ B em células U-937 tratadas com o composto 4J é semelhante ao de células tratadas somente com LPS, ou seja, intranuclear. Resultados semelhantes são relatados em outros estudos com derivados de imidazopiridinas, também pela inativação de NF κ B, demonstrando efeito em constructos de genes repórteres (RETHEER, et al., 2008) e utilizando microscopia confocal (LI et al., 2015; QIAN et al., 2016), com padrões de marcação citoplasmática - ou nuclear reduzida – com a aplicação de seus compostos.

A fim de reiterar a capacidade de inibição da ativação de NF κ B pelo composto 4B, o padrão de fosforilação de I κ B- α foi analisado por citometria de fluxo. A ativação de monócitos/macrófagos por LPS leva à fosforilação e subsequente degradação de I κ B- α , reduzindo suas quantidades no citoplasma (TAK, 2001). O padrão encontrado em nossos resultados sugere que o composto 4B impede o processo de fosforilação de I κ B- α , que se mantém então fisicamente associado a NF κ B e impede sua translocação para o núcleo, como evidenciado nos resultados de microscopia confocal e citometria de fluxo (Figuras 18 e 19). O tratamento com LPS leva a um aumento de 2,1 vezes na fosforilação de I κ B- α , revertido pelo tratamento com o composto 4B, que diminui a quantidade de I κ B- α fosforilada em 28,04%. Assim como nossos dados sobre a translocação de NF κ B encontram correspondência na literatura, outros compostos derivados de imidazopiridinas também demonstraram efeitos sobre a degradação de I κ B, como os testados por LI et al., 2015 e QIAN et al., 2016.

Outra via relacionada à produção de TNF- α por monócitos e macrófagos é a via de MAPKs, que tem papel na estabilização do mRNA de TNF- α , atuando no controle pós-transcricional da produção desta citocina. Patógenos bacterianos, por exemplo, desenvolveram mecanismos para evadir a resposta do hospedeiro através da inibição da sinalização por MAPKs e NF κ B (BALDARI, 2006; ROY, 2007), que constituem as duas maiores vias de sinalização ativadas por TLRs (WALL et al., 2009). Conforme nossos resultados, o tratamento de células U-937 com LPS leva à maior expressão de p38-MAPK quando comparado a células não tratadas (aumento de 1,7 vezes), indicando que a ativação de TLR4 leva não só à maior translocação de NF κ B, mas também à maior estabilização do mRNA de TNF- α produzido pela célula. O tratamento com o composto 4B, conhecidamente inibidor da translocação de NF κ B, causa também a redução da expressão de p38-MAPK induzida por LPS (redução de 16,19%). Mesmo ainda maior que a expressão de p38-MAPK por células não tratadas, o efeito da modulação de p38-MAPK pelo composto 4B indica que o mesmo exerce controle da produção de TNF- α tanto a nível transcricional, quanto ao nível pós-transcricional (Figura 19).

Conhecidamente, outras proteínas e quinases estão envolvidas na transdução de sinal de TLR4 ligado a LPS. É possível que além das proteínas analisadas, o composto 4B interaja ou module a ação do próprio TLR4, ou de proteínas adaptadoras, como Myd88 (O'NEILL, 2007). Outro componente importante da via de sinalização do NF κ B é o complexo IKK, responsável pela fosforilação de I κ B (TAK, 2001). Todos estímulos pró-inflamatórios atualmente conhecidos, incluindo citocinas, vírus e LPS, requerem IKK para a ativação de NF κ B (O'CONNELL, 1998), tornando-o um possível objeto de análise futura. É improvável que os compostos 4B e 4J se liguem diretamente ao LPS e impeçam sua ligação a TLR4, visto que ensaio demonstraram que a administração de 4B e 4J previamente ao tratamento com LPS também foram capazes de reproduzir os efeitos destas moléculas (dados não mostrados).

6.3. A regulação de cAMP e NO pelo composto 4J

Além da via clássica da regulação de citocinas por NF κ B, a produção de TNF- α está sob o controle de outros fatores, como cAMP e NO. De maneira geral, cAMP inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de TLRs e NF κ B, como

TNF- α (PALLADINO, 2003), mas seus mecanismos de controle fino ainda não foram exatamente elucidados (BRYN, 2006). Conhecidamente, aumento nos níveis de cAMP ativam PKA, uma quinase que fosforila fatores de transcrição que se ligam ao promotor de TNF- α , inibindo a transcrição do mRNA correspondente (ZHONG et al., 1995). Os efeitos anti-inflamatórios de cAMP têm sido relacionados à regulação da atividade de NF κ B (MUSTAFA, 1998; NEUMANN, 1995). A elevação de cAMP não previne a ativação de NF κ B induzida por LPS ou TNF- α na linhagem celular de monócitos humanos (THP1), embora cAMP ainda assim iniba a transcrição de genes mediada por NF κ B. Propõe-se que tal inibição ocorra pela inibição de NF κ B intranuclear (OLLIVIER, 1996). Em monócitos periféricos, a elevação de cAMP também não inibe a ativação de NF κ B induzida por LPS. Além do mais, a expressão de mRNA de TNF- α induzida por LPS não é influenciada pela elevação dos níveis de cAMP, sugerindo que cAMP também regule a produção de TNF- α através de um mecanismo pós-transcricional (SHAMES, 2001).

Os níveis de cAMP, por sua vez, podem ser regulados pelos níveis de NO (WANG, 1997). Tal regulação pode se dar pela síntese reduzida de cAMP pela adenilato ciclase, ou pela degradação aumentada por maior atividade de PDE, contudo a diminuição mantida mesmo com o uso de inibidores de PDE suportam a hipótese da síntese de menor síntese, ao invés de maior degradação, embora os mecanismos exatos permaneçam desconhecidos (GILL, 1979). Reiterando tal hipótese, o tratamento de células com doadores de NO diminui a produção de cAMP por inibição da atividade de adenilato ciclase (DUHE et al., 1994). De maneira também condizente, o uso de análogos de cAMP previne os efeitos de NO, reiterando a importância de cAMP na regulação da síntese de TNF- α à nível transcricional, como já demonstrado anteriormente (PRABHAKAR et al., 1994; SELDON et al., 1995). Ainda no contexto inflamatório, a síntese de NO é controlada por enzimas chamadas iNOS, presentes em macrófagos (FÖRSTERMANN et al., 1995). Apesar dessas enzimas terem atividade constitutiva, LPS pode induzir sua expressão e atividade (ZIDEK, 2001), colocando NO como um reconhecido marcador da inflamação e imunoativação (KAUR, 1994).

Sabendo que a produção de TNF- α pode ser regulada por cAMP e NO, o presente trabalho investigou a possibilidade dos compostos 4B e 4J alterarem os

níveis destes mensageiros como forma de atuação alternativa à inibição de NFkB, visto que a inibição de TNF- α por 4J não parece ocorrer devido a este processo.

A produção de cAMP por células U-937, avaliada por ensaio de imunocompetição, nossos resultados sugerem que células U-937 têm expressão constitutiva de cAMP (57,29pmol/mL), condizente com a necessidade destas moléculas para a função celular normal (Figura 20). O tratamento com veículo, DMSO, causou redução na produção de cAMP (38,95pmol/mL), provavelmente devido à ativação de alguma via de resposta ao DMSO. Não obstante, LPS, reduziu a expressão de cAMP em 1,93 vezes (29,65pmol/mL), condizente com o fato de que cAMP, em essência, atua como anti-inflamatório. Dessa maneira, o estímulo pró-inflamatório com LPS, reduzindo a expressão de cAMP, não inibiria a produção das citocinas induzidas por este tipo de ligante. O tratamento de células U-937 com o composto 4B não causou mudança significativa nos níveis de cAMP quando comparado com células não tratadas, ou quando comparado ao estímulo com LPS, indicando que 4B não atua na modulação dos níveis de cAMP, ou que existem mecanismos de *feedback* que não permitem a detecção das mudanças causadas especificamente pelo tratamento com 4B. Por sua vez, o tratamento com composto 4J elevou a produção de cAMP à níveis altos, de 90pmol/mL, um aumento de 1,57 vezes quando comparado as células não tratadas e de 3,03 vezes quando comparado as células estimuladas somente com LPS. Conforme a literatura supracitada, o tratamento com 4J, ao modular os níveis de cAMP, atua também sobre a regulação da produção de TNF- α , indicando que o mecanismo de atuação deste composto é independente de NFkB, mas dependente de outras moléculas sinalizadoras, como cAMP.

Visto que já bem estabelecida está a regulação dos níveis de cAMP pela produção de NO, pela qual altos níveis de NO levam à redução nos níveis de cAMP, o presente trabalho tratou de buscar evidências de sua íntima correlação. Apesar dos mecanismos exatos pelos quais está regulação acontece não estarem bem delineados, determinar a relação entre os dois com o uso de derivados de imidazopiridinas pode sugerir mecanismos de ação envolvendo o tratamento com estes compostos.

Nossos resultados do ensaio de Griess sugerem que células U-937 produzem níveis baixos e constitutivos de NO (9,19 μ M), não alterados pela aplicação do veículo, DMSO (Figura 21). A estimulação com LPS causou grande elevação na produção de NO (68,13 μ M), condizente com os resultados anteriores da produção de cAMP, reduzida com o uso de LPS. Quando comparado ao tratamento com LPS, o tratamento com composto 4B causou decréscimo nos níveis de NO (54,92 μ M). Tal efeito pode estar relacionado com o fato de que a expressão e ativação de NFkB controla, ao menos em parte, a produção de NO, a partir da regulação de iNOS (ZHONG, 2002). Ainda de maneira condizente com os resultados vistos na produção de cAMP, o tratamento com o composto 4J induziu queda considerável dos níveis de NO (18,05 μ M), de 3,77 vezes.

Os resultados obtidos sobre a produção de cAMP e NO provêm uma boa base para o entendimento da maneira pela qual a utilização de compostos pode regular a produção de TNF- α mesmo sem interferir nas vias de sinalização controladas por NFkB. Em células mononucleares, a elevação dos níveis de cAMP reduzem a produção de TNF- α (KAMBAYASHI, 1995; EIGLER, 1998). Tal via de modulação da expressão de citocinas parece ser independente da ativação da via de NFkB, condizente com estudos que sugerem que a elevação de cAMP não atenua a ativação de NFkB induzida por LPS, ou a expressão do mRNA de TNF- α , embora a secreção de TNF- α seja atenuada (OLLIVIER, 1996; NEUMANN, 1995). Nossos dados então sugerem que o tratamento com o composto 4J inibe a produção de TNF- α pelo aumento dos níveis de NO, e subsequente redução dos níveis de cAMP, diferente do tratamento com o composto 4B, que parece atuar exclusivamente na via de NFkB. Apesar disso, a possibilidade do composto 4B atuar indiretamente em tais vias não se pode excluída, como visto pela redução na produção de NO em células tratadas com o composto 4B. Um dos genes transcricionalmente controlados por NFkB é o gene de iNOS (ZHONG, 2002). A ativação de NFkB permite sua interação com o gene de iNOS em sua região promotora, induzindo sua transcrição (XIE, 1994). Visto que o tratamento com o composto 4B inibe a ativação de NFkB, sugere-se que há também menor expressão de iNOS e, conseqüentemente, redução nos níveis de NO, mesmo que mais branda do que a induzida pelo tratamento com o composto 4J.

Durante a resposta inflamatória, macrófagos e neutrófilos ativados produzem grandes quantidades de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (VAN BERLO, 2010).

Produtos de RNS incluem NO, que pode reagir com uma variedade de alvos (VALKO, 2007). No estado fisiológico, a produção de RNS é controlada por enzimas anti-oxidantes. A produção destas enzimas é regulada pelo fator de transcrição nuclear Nrf-2 (ZAKKAR, 2009). Em modelos de camundongos sépticos, a atividade de Nrf2 pode ser induzida com o uso de compostos anti-oxidantes, prevenindo o acúmulo de RNS e NO (BELL et al., 2011; KENSLER, 2010). Dessa maneira, os mecanismos de ação que envolvem a diminuição da produção de NO com a utilização do composto 4J podem estar envolvidos na regulação de Nrf2, ou simplesmente por uma propriedade anti-oxidante de 4J em si. As vias específicas de controle da redução dos níveis de cAMP por NO, contudo, permanecem desconhecidas. Uma alternativa de ação para o composto 4B é que o mesmo seja capaz de modular a atividade de adenilato ciclase ou PDE. A ação de 4J sobre a produção de TNF- α certamente envolve a modulação dos mensageiros celulares cAMP e NO, porém o mecanismo de ação específico, bem como seus alvos moleculares, ainda precisa ser identificado.

6.4. 4B e 4J como inibidores de TNF- α e seus possíveis mecanismos

Os resultados deste estudo sugerem o uso de derivados de imidazopiridinas, em especial os compostos 4B e 4J, como inibidores de TNF- α , impedindo sua produção por células de linhagem U-937 e macrófagos peritoneais. Estes compostos apresentam baixa citotoxicidade em células de linhagem, porém causam redução significativa e considerável de células primárias isoladas de camundongos, demonstrando necessidade de aprimoramento de suas estruturas moleculares a fim de manter sua função, porém reduzir seu impacto na viabilidade celular.

Foi obtido sucesso no uso de ambos os compostos na inibição da produção de TNF- α , nos dois tipos celulares testados. As concentrações calculadas para o IC50 dos compostos são relativamente baixas, com concentrações próximas de 10 μ M no caso do composto 4J, resultando também em baixa quantidade de DMSO no veículo presente nos tratamentos. Devido ao fato destes compostos serem moléculas inéditas e, portanto, com solubilidade, efeitos, farmacodinâmica e farmacocinética desconhecidas, a elucidação das vias de sinalização e regulação intracelulares moduladas pelos compostos é essencial para um melhor entendimento de sua ação biológica.

Segundo nossos resultados, o composto 4B atua na via clássica de produção de TNF- α pela ativação de NF κ B. O tratamento com 4B impediu a translocação de NF κ B para o interior do núcleo das células, impedindo-o de exercer suas funções normais, como indução da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. A ativação de monócitos e macrófagos por ligantes de TLR4 (a exemplo do LPS, utilizado neste estudo) leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , pela transdução de sinal envolvendo diversas proteínas e quinases. Entre as moléculas envolvidas nestas vias, foram avaliadas a fosforilação de I κ B- α (essencial para a translocação de NF κ B para o núcleo) e a expressão de p38-MAPK, quinase importante para a manutenção da estabilidade do mRNA de TNF- α . No modelo testado, o tratamento com o composto 4B inibe a fosforilação de I κ B- α e reduz a expressão de p38-MAPK, sugerindo ter um alvo algo encontrado *upstream* de NF κ B. A identificação específica do alvo (ou dos alvos) de 4B é importante para entender seu real funcionamento, se fazendo necessário mais estudos para compreender os efeitos desta molécula em sua totalidade.

O composto 4J, também eficiente na inibição da produção de TNF- α , por outro lado, não demonstrou ter efeitos na via clássica de ativação de NF κ B, sem impedir sua translocação para o núcleo. Diferente de 4B, contudo, 4J demonstra efeitos significativos em outra via de regulação da produção de TNF- α , envolvendo a produção de cAMP e NO. O composto 4J induz redução nos níveis de NO, ao passo que aumenta a produção de cAMP. Devido ao desconhecimento do alvo específico da molécula, não é possível relatar se a diminuição nos níveis de cAMP é resultado da menor produção de NO pela célula. Esta é, contudo, uma forma conhecidamente ativa de controle da produção de cAMP e, por conseguinte, da produção de TNF- α (WANG et al., 1997). Como possíveis alvos, 4J pode atuar na regulação do fator de transcrição Nrf-2, controlando a produção de antioxidantes e espécies reativas de oxigênio, agir sobre a enzima iNOS, ou até mesmo controlar os níveis de produção de cAMP por modulação da atividade de enzimas como adenilato ciclase e PDE. A identificação dos alvos específicos também requer uma maior quantidade de estudos envolvendo essa molécula.

Coletivamente, nossos dados são sumarizados na Figura 24, identificando as vias conhecidamente moduladas por 4B (Figura 24A) e 4J (Figura 24B), bem como sugerindo potenciais interações e alvos para estas moléculas.

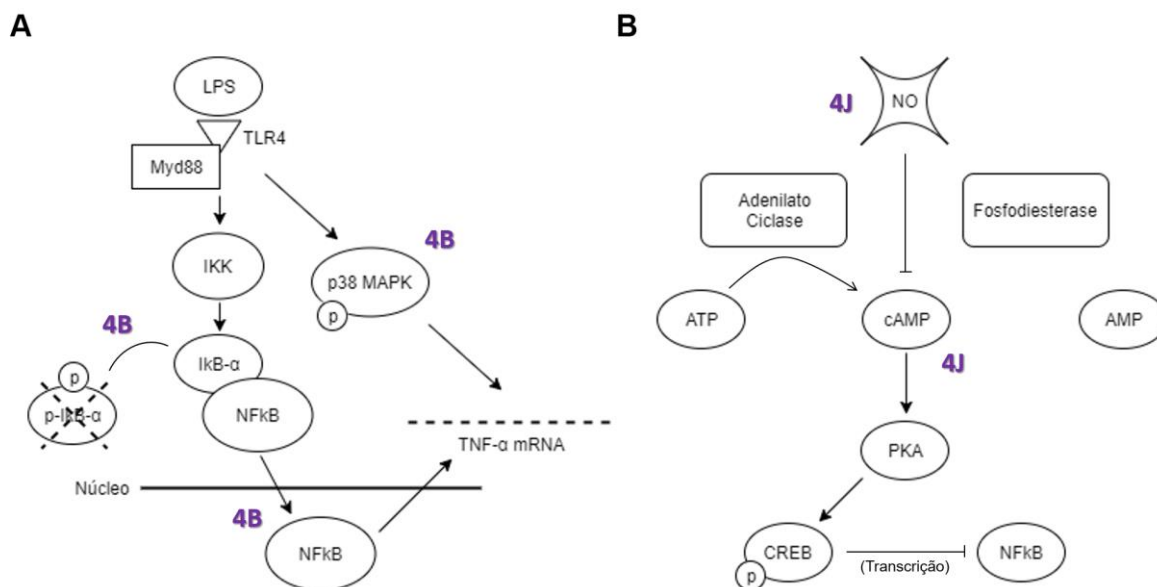


Figura 24. Vias de sinalização alteradas pelo tratamento com derivados de imidazopiridinas. O tratamento com o composto 4B (A) altera o funcionamento da via clássica de NFκB, atuando sobre a fosforilação de IκB-α e p38-MAPK, bem como sobre a translocação e NFκB. O tratamento com o composto 4J (B) atua sobre a via regulatória de NO e cAMP.

6.5. Espectro de ação e efeitos *in vivo* do tratamento com 4B e 4J.

Dada a atividade inibitória sobre a produção de TNF-α dos compostos 4B e 4J, juntamente com a elucidação parcial de seus mecanismos efetores e vias de ação em células U-937, estes se mostram promissores para o desenvolvimento de fármacos inibidores da produção de TNF-α baseados em pequenas moléculas.

As duas últimas décadas revolucionaram o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, espondilite anquilosante, psoríase, doença inflamatória do intestino e muitas outras (PRADO et al., 2017). Ao final dos anos 90, o tratamento de pacientes com artrite reumatoide era baseado somente no uso de drogas antirreumáticas e medicamentos imunossupressivos. Medicamentos como metotrexato (MTX), sulfasalazina, leflunomida, ciclosporina e azatioprina faziam parte dos pilares do tratamento da artrite reumatoide (MALVIYA et al., 2013; DA MOTA et al., 2012). Atualmente a terapia anti-TNF-α é considerada padrão para tratamento

desta doença, após seu relato de sucesso em diversos estudos e testes clínicos. Em 70 a 80% dos casos, este tipo de terapia é ainda utilizada em combinação com MTX, devido ao sucesso da combinação dos diferentes fármacos em testes clínicos (REINHART et al., 1996; REINHART et al., 2001). Baseando-se nos bons resultados da aplicação destas terapias, fica evidente o racional do uso de terapias anti-TNF- α para o tratamento de diversas outras doenças inflamatórias (PANACEK et al., 2004). Doença de Chron, colite ulcerativa, psoríase e espondilite anquilosante também já têm indicação aprovada para o uso desta categoria de fármacos (LV et al., 2014). Apesar do sucesso do uso de agentes anti-TNF- α no tratamento das doenças supracitadas, o primeiro uso proposto para terapias anti-TNF- α foi no tratamento da sepse (GALLAGHER et al., 2001) que, apesar de um racional claro e sucesso em modelos experimentais, não teve, até hoje, sucesso em testes clínicos (ABRAHAM et al., 1998; GHEZZI, 2005).

Sepse, sepse severa e choque séptico despontam como maior causa de morbidade e mortalidade em unidades de tratamento intensivo (PAORILLO et al., 1990; ANGUS et al., 2001). O tratamento da sepse geralmente se foca no controle da infecção como meio de restauração das funções vitais do paciente (SHARMA, 2006). Já que alvejar a resposta inflamatória do hospedeiro à infecção pode ser benéfico aos pacientes, o foco tem se concentrado em desenvolver agentes imunomodulatórios para aplicação no contexto clínico da sepse (LV et al., 2014).

Conhecidamente, citocinas pró-inflamatórias são vitais para o desenvolvimento da sepse (NAWROTH et al., 1986). TNF- α , por exemplo, atua como principal ativador da cascata inflamatória (SPOONER, 1992), causando a manifestação de muitos dos sintomas clínicos observados em pacientes sépticos (PAORILLO et al., 1990). Modelos animais de infecção e sepse, inclusive, indicam que o bloqueio da via de TNF- α pode atrasar a progressão da doença (ESKANDARI, 1992; ECHTENACHER, 2001; AIKAWA et al., 2013). Dessa forma, agentes anti-TNF- α continuam a ser investigados como forma de tratamento clínico da sepse, embora o assunto tenha permanecido bastante controverso. (LV et al., 2014). Com o presente estudo objetivando a inibição de TNF- α por pequenas moléculas derivadas de imidazopiridinas, sua aplicação em patologias nas quais as alternativas disponíveis são ineficazes, a exemplo da sepse, se torna um campo de estudo interessante e promissor. Além de TNF- α , outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IFN- γ , IL-

12p70 e CCL20/MIP3- α têm sido relatadas como importantes reguladores do processo inflamatório e progressão da sepse (CHAUDHRY et al., 2013; ROMERO et al., 2010; SAITO, 2006; KITAGAWA et al., 2013).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos em resposta à moléculas microbianas específicas, como LPS (CHAUDHRY et al., 2013). Esta citocina possui uma diversidade de efeitos biológicos, incluindo a ativação de linfócitos B e T, regulação do sistema de coagulação e modulação da hematopoese (BORDEN< 1994; VAN DER POLL, 1994). IL-6 também é relevante para a progressão de diversas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e doenças autoimunes, sugerindo que IL-6 também tenha papel importante na sepse (ISHIHARA, 2002; LUKASZEWICZ, 2007; PATTERSON ET AL., 2010). Condizente com tal sugestão, a produção de IL-6 é elevada em pacientes sépticos (MERA et al., 2011; GOUEL-CHERON et al., 2012). Estudos clínicos indicam que os níveis de IL-6 são aumentados em pacientes com choque séptico e sepse severa (WU, et al., 2009), ressaltando o papel de IL-6 como citocina-chave na patofisiologia da sepse. Como método particular para o diagnóstico da sepse, os níveis plasmáticos de IL-6 têm sido relacionados com a taxa de mortalidade da doença, sugerindo um potencial de IL-6 como marcador da progressão desta patologia (KELLUM et al., 2007; KUMAR et al., 2009). Os mecanismos precisos pelos quais IL-6 regula o desenvolvimento e progressão da sepse, contudo, permanecem desconhecidos (CHAUDHRY et al., 2013). Curiosamente, em contraste à injeção de TNF- α , a injeção somente de IL-6 não produz um estado séptico em modelos animais (PREISER et al., 1991). Uma das funções chave de IL-6 é a indução de febre e a mediação da fase aguda da inflamação, processos importantes no desenvolvimento do choque séptico (KOPF et al., 1994; STEENBERG et al., 2003).

IFN- γ , por sua vez, tem importante papel imunorregulatório, principalmente na resposta à uma gama de infecções patogênicas. Camundongos deficientes na produção de IFN- γ são mais susceptíveis à patógenos intracelulares, como *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacteria* (WANG et al., 1994; HUANG et al., 1993; COOPER et al., 1993). A neutralização de IFN- γ e seus receptores tornam camundongos mais resistentes ao choque séptico induzido por LPS (HEINZEL, 1990; CAR et al., 1994). De maneira condizente, IFN- γ normalmente não é detectável no plasma de humanos saudáveis, mas seus níveis são elevados em pacientes sépticos (CALANDRA et al., 1990). Um estudo recentemente publicado

demonstrou que IFN- γ está envolvido na imunoparalisia associada à sepse, identificando esta citocina como potencial opção para o tratamento da sepse (LEENTJENS et al., 2012).

A citocina IL-12 regula a resposta imune e promove o desenvolvimento da resposta imune adaptativa tipo 1, caracterizada por aumento da resposta fagocíticas de células mononucleares. Assim, IL-12 faz a conexão entre a resposta inicial, não-específica, e a resposta imune tardia (SCHULTE, 2013). Sua produção e liberação induz a produção de IFN- γ por células T e células NK, diretamente ativando macrófagos a aumentar sua atividade bactericida e produzir citocinas Th1 adicionais (ESTAQUIER et al., 1995). Apesar dos muitos anos de pesquisa, o papel de IL-12 na sepse se mantém controverso. Concentrações aumentadas de IL-12 foram encontradas no plasma de animais após a administração de LPS de *Escherichia coli* e em modelos de CLP (STEINHAUSER et al., 1999; ZISMAN et al., 1997; JANSEN et al., 1996). A neutralização ou deleção gênica de IL-12 também resulta em maior mortalidade de camundongos em modelos de sepse (MORENO et al., 2006). Clinicamente, um estudo prospectivo com pacientes de cirurgia visceral sugere que pacientes com baixa produção pré-operatória de IL-12 são mais susceptíveis a infecções pós-operatórias, aumentando assim, o risco de desenvolvimento e letalidade da sepse (WEIGHARDT et al., 2002).

CCL20 (ou MIP3- α) é uma citocina pró-inflamatória originalmente identificada como quimioatraente de linfócitos e células dendríticas (VARONA et al., 2001). A produção aumentada de CCL20 é relatada em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, psoríase e dermatites (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Sua produção por células mononucleares é induzida por lipopolissacarídeos e outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ (BORGNE et al., 2006). CCL20 também é predominantemente expressa *in vivo* pelo epitélio intestinal, especialmente na resposta a estímulos inflamatórios (TANAKA et al., 1999). Efeitos benéficos da neutralização de CCL20 foram relatados em casos de choque séptico (DIAL, 2005; HORINO et al., 2005). Mais estudos, porém, são necessários para elucidar o exato papel de CCL20 no controle da progressão da sepse (KITAGAWA et al., 2013).

Pesquisas recentes sobre os mecanismos patofisiológicos da sepse indicam que a resposta pró-inflamatória inicial gera como resposta a produção de certas

citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, TGF- β e IL-4, na tentativa de restaurar o equilíbrio imunológico (JUNGER et al., 1996; COHEN, 2002). Mais recentemente, outras citocinas como IL-13, IL-15, IL-22 e IL-33 também têm sido relacionadas à progressão da sepse, requerendo uma maior compreensão de seus mecanismos de atuação (COLLIGHAN et al., 2004; INOUE et al., 2010; BINGOLD et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2017).

IL-10 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T e células NK (LATIFI, 2002). Estudos funcionais revelaram uma gama de funções anti-inflamatórias de IL-10. *In vitro*, IL-10 suprime a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ em células do sistema imunológico (MALEFYT et al., 1991; FIORENTINO et al., 1991). Tais resultados são suportados por estudos *in vivo*. No modelo experimental murino, a administração de IL-10 recombinante protege camundongos da endotoxemia letal, mesmo com injeção de IL-10 30 minutos após a administração de LPS (HOWARD et al., 1993). Em contraste, a neutralização de IL-10 eleva os níveis de TNF- α e IL-6 circulante em camundongos e reverte a capacidade protetiva de IL-10 na endotoxemia (VAN DER POLL et al., 1995). A administração de IL-10 recombinante também aumentou a sobrevivência e a janela terapêutica de camundongos sépticos, sugerindo que IL-10 pode regular a transição entre os estados séptico e de sepse severa/choque séptico (ZENG et al., 2009).

IL-13 é uma citocina anti-inflamatória que, juntamente com IL-4, direciona e modula a resposta imune. Inicialmente descrita como inibidora da resposta Th1 (MINTY et al., 1993), seu papel como mediadora imune tem sido desvendado e distinguido do papel de IL-4 na resposta inflamatória (RAMALINGAM, et al., 2008). IL-13 é considerada citocina-chave na defesa contra nematoides gastrointestinais (WYNN, 2003) e tem papel central em doenças inflamatórias crônicas, como asma e colite ulcerativa (FUSS, 2008). IL-13 é potente inibidora da secreção de IL-6 induzida por LPS, e da produção de mRNAs de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β (COLLIGHAN et al., 2004). A maioria dos estudos envolvendo IL-13 e sepse foram realizados em camundongo, nos quais a indução rápida de IL-13 foi relatada após a indução de sepse pelo modelo de CLP (KELLUM, 1996). A neutralização de IL-13 é prejudicial à sobrevivência de camundongos sépticos, indicando que IL-13 tem papel protetivo durante o curso da sepse (MATSUKAWA et al., 2000).

A citocina IL-15 é membro da família de citocinas com receptor de cadeia γ , que inclui IL-2, IL-4, IL-9 e IL-21 (LUCAS et al., 2007). IL-15 coordena as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro, com caráter protetivo (MOTEGI et al., 2008). IL-15 é essencial para a diferenciação de células TCD8, células dendríticas e células NK, atividades importantes para a resposta efetiva do hospedeiro à microrganismos (LUCAS et al., 2007). Na sepse, a maioria dos pacientes tem dificuldade na erradicação do patógeno invasor, sendo susceptíveis à infecções hospitalares secundárias (INOUE et al., 2010). Devido aos diferentes efeitos de IL-15 na função de diversas células imunes efectoras, esta citocina se torna um fator crítico na patogênese da sepse, representando um candidato terapêutico lógico (WESCHE-SOLDATO et al., 2007).

IL-22 é uma citocina pertencente à família de IL-10 (ZIESCHE et al., 2009), encontrada expressa por células T ativadas, macrófagos e células NK (WOLK et al., 2006). De maneira similar a IL-6, IL-22 parece ser capaz de mediar a funções pró e anti-inflamatórias, dependendo do contexto patofisiológico (AUJLA, 2009). Por exemplo, IL-22 tem papel protetivo em modelos murinos de doença inflamatória do intestino, ao passo que direciona a inflamação em modelos de psoríase e artrite murina (ZENEWICZ, 2008). Tal papel ambíguo o processo inflamatório coloca IL-22 como citocina importante também na polarização de macrófagos (M2). Geralmente macrófagos M1 são induzidos por IFN- γ , IL-6 e TNF- α , promovendo a reação inflamatória, ao passo que macrófagos M2 são induzidos por IL-4, IL-10 e IL-13, exibindo reação anti-inflamatória (NIKOLIC-PATERSON, 2014). Recentemente IL-22 foi relatada como potente indutora de perfil M2 em macrófagos, via regulação da via de STAT 3 (LUO et al., 2016). A indução de IL-22 e seu receptor (IL-22R1) foi demonstrada em modelos de sepse *in vivo*. A inibição da função de IL-22 durante a sepse utilizando antagonistas de IL-22 influencia a produção de citocinas na resposta do hospedeiro a infecção (WEBER et al., 2007).

IL-33 é uma citocina membro da família de IL-1 e importante mediadora da resposta imune do tipo 2 (14 14919). Além do mais, IL-33 atua em sinergia com IL-4 promovendo a polarização de macrófagos para o perfil M2, anti-inflamatório (17 14919). Diversos tipos de células do sistema imunológico são capazes de produzir IL-33 (MIRCHANDANI et al., 2012). Das células envolvidas na resposta imune inata, macrófagos, em especial, são uma importante fonte de IL-33 durante o processo

infeccioso (Qi et al., 2015). Na sepse, foi relatada uma alta produção de IL-33 em camundongos sobreviventes ao choque séptico, evidenciado um possível papel imunossupressor para IL-33 na progressão da sepse (NASCIMENTO et al., 2017). Apesar de conhecidamente importante para o desenvolvimento da sepse e polarização de macrófagos para o perfil M2, os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não são bem elucidados (FURUKAWA et al., 2017).

Evidenciada a relevância dos papéis de citocinas pró e anti-inflamatórias no desenvolvimento da sepse, nosso estudo provê resultados importantes sobre a modulação destas citocinas pela aplicação dos compostos 4B e 4J em células U-937 (Figura 22). De maneira geral, os compostos testados induzem a inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12p70 e CCL20 quando aplicados junto ao LPS. Segundo nossos resultados, em todos os casos, regulação destas citocinas é alterada pelo tratamento com o composto 4B, enquanto o tratamento com o composto 4J influencia apenas a produção de TNF- α e IL-6. Possivelmente, a via de NO-cAMP, alterada pelo tratamento com o composto 4J não interfere na produção das demais citocinas supracitadas, ao passo que o tratamento com o composto 4B, pela inibição de NF κ B e p38-MAPK, parece ser capaz de modular uma gama muito maior de citocinas, tanto pró quanto anti-inflamatórias. Avaliando o tratamento de células U-937 com os compostos 4B e 4J é possível observar um padrão de inibição de citocinas pró-inflamatórias aliado a um padrão de indução da produção de citocinas anti-inflamatórias. IL-10, IL-13, IL-15, IL-22 e IL-33 tiveram sua produção aumentada pelo tratamento com o composto 4B quando comparadas ao estímulo com LPS. Tal fato leva a crer que, além da relatada inibição de TNF- α , o tratamento com o composto 4B é capaz de induzir uma resposta anti-inflamatória, mediada pelas citocinas supracitadas. Apesar do ainda desconhecimento das vias envolvidas na regulação de todas estas citocinas, o padrão de produção de citocinas induzido pelo tratamento com os compostos 4B e 4J leva a crer que tais moléculas tenham potencial ação de inibir o processo inflamatório clássico induzido pela infecção da sepse, levando à polarização de macrófagos para o perfil M2, majoritariamente anti-inflamatório. Tais resultados ressaltam o potencial de aplicação destes derivados de imidazopiridinas no modelo de sepse, bem como seu potencial desenvolvimento como fármaco para o tratamento desta patologia.

A fim de avaliar se os resultados obtidos no presente estudo eram de fato condizentes com a modulação do estado séptico, estudos *in vivo* foram realizados para comprovar a eficácia destas moléculas como possível tratamento da sepse. Para tal, camundongos C57BL/6 foram injetados com dose letal de LPS (10mg/kg), a fim de instalar o modelo de sepse nos indivíduos (Figura 23). Para avaliar o efeito protetivo dos compostos 4B e 4J, os mesmos foram injetados previamente (15 minutos antes), na concentração de 10mg/kg, nos animais em questão. Grupos controle, injetados apenas com os compostos 4B e 4J também foram utilizados, para ressaltar a possibilidade de aplicação dos compostos sem danos ao organismo. Os experimentos de teste de ação hemolítica dos compostos 4B e 4J comprovaram que ambos não causam hemólise de glóbulos vermelhos, sugerindo serem passíveis de aplicação *in vivo*.

Nossos resultados mostram diferenças significativas da coadministração dos compostos 4B e 4J quando comparados à administração apenas da dose letal de LPS. O tratamento com o composto 4J permitiu a sobrevivência de todos os indivíduos, tanto no grupo tratado com LPS, quanto no grupo que recebeu apenas o tratamento com o composto 4J. Em contraste, o tratamento com o composto 4B aliado a LPS levou à morte de dois indivíduos em 24h de tratamento, com apenas um indivíduo sobrevivendo até o final do experimento. Os efeitos do tratamento com 4B na morte dos indivíduos não parece ser devido à aplicação do composto em si (visto que todos animais deste grupo sobrevieram ao experimento), mas sim da ineficácia de atividade protetiva quando comparado ao tratamento com o composto 4B, sugerindo que tais compostos não são capazes de, por si só, levar à morte dos indivíduos. Além disso, ambos os compostos mostram efeito protetivo significativo quando comparados aos animais tratadas apenas com LPS, ressaltando a manutenção de sua atividade no modelo *in vivo* de sepse. Avaliações semelhantes demonstram também efeito protetivo de outros derivados de imidazopiridinas sobre o modelo de sepse induzida em camundongos (CHEN et al., 2013).

As causas possíveis envolvendo a menor eficácia do tratamento com o composto 4B de impedir a morte dos indivíduos no tratamento conjunto com LPS pode ser devido a diversos fatores. A aplicação *in vivo* traz muitas diferenças quando comparada à testes *in vitro* com células de linhagem ou células primárias. Uma das possíveis razões para a baixa eficiência do tratamento pode se referir à dose testada

que, no organismo vivo, pode ser muito baixa para que os efeitos do tratamento com o composto 4B realmente sejam efetivos. Outros fatores como o sequestro por proteína séricas, ou agregação do composto quando injetado *in vivo* podem também fazer com que sua aplicação necessite de revisão e melhoria para a efetividade do tratamento *in vivo*.

Em suma, os derivados de imidazopiridinas 4B e 4J, possuem, de fato, potencial para a inibição da produção de TNF- α , colocando-os como moléculas expoentes no desenvolvimento de novos fármacos para o combate de doenças inflamatórias crônicas. Como vantagens sobre as terapias anti-TNF- α utilizadas atualmente, a síntese de derivados de imidazopiridinas pelo método de reação multicomponente possui um custo muito mais reduzido do que a produção de anticorpos monoclonais anti-TNF- α . Além disso, por não serem estruturas proteicas ou biológicas, não tem a elas adicionado o risco de gerar imunogenicidade, característica presente em todas as terapias atuais e responsável, em grande parte, pela falta de resposta ao tratamento e por efeitos adversos danosos aos pacientes. Outra possível facilidade do uso de pequenas moléculas como fármacos anti-TNF- α , é a forma de administração da droga. Pequenas moléculas podem ser formuladas mais facilmente de forma a serem administradas, por exemplo, por via oral, forma de administração dificilmente utilizada para fármacos de origem proteica, devido à capacidade do trato digestório de degradar tais moléculas com facilidade.

Assim sendo, os derivados de imidazopiridinas 4B e 4J entram para a seleta lista de pequenas moléculas comprovadamente efetivas na inibição de TNF- α e com potencial de desenvolvimento à fármacos amplamente utilizados. No presente estudo, as moléculas desenvolvidas são consideradas a primeira geração de IMPs, tendo como objetivo o aprimoramento e reestruturação das moléculas a fim de obter próximas gerações que sejam mais eficientes e com menos efeitos adversos associados.

7. CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtidos em nosso trabalho sugere que dos oito derivados de imidazopiridinas testados, dois deles, 4B e 4J, tem efeito sobre a inibição de TNF- α em concentrações aceitáveis para uso, considerando o modelo de células de linhagem U-937. Além disso, os compostos tiveram parte dos seus mecanismos de ação desvendados, mostrando diferentes métodos de inibição da produção de TNF- α . 4B atua pela inibição da via clássica de NF κ B, ao passo que 4J modula os níveis de cAMP e NO. Em adição à regulação da produção de TNF- α , os compostos 4B e 4J demonstram atividade sobre a síntese de outras citocinas, tanto pró-inflamatórias (IL-6, IFN- γ , IL-12p70 e CCL20) quanto anti-inflamatórias (IL-10, IL-13, IL-15, IL-22 e IL-33), levando, de maneira geral, à redução de mediadores pró-inflamatórios e ao aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, expandindo ainda mais seu potencial de interesse farmacológico. A validação da atividade dos compostos no modelo *in vivo* de sepse nos leva a concluir que os compostos mantêm sua atividade em camundongos, sem causar danos aparentes associados à sua aplicação, evidenciado pelo tratamento de animais apenas com os compostos 4B e 4J.

O tratamento de células do sistema imunológico (U-937 e macrófagos peritoneais) com os compostos demonstrou que os compostos têm efeitos citotóxicos dose dependente, de maneira que a concentração inibitória de 50% (IC50) da produção de TNF- α se mostra passível de aplicação na linhagem celular U-937, com toxicidade aumentada em macrófagos peritoneais.

O mecanismo de inibição da produção de TNF- α resultante do tratamento com o composto 4B tem como base a inibição da ativação do fator de transcrição de NF κ B induzida pela ligação de LPS ao receptor TLR4. O tratamento com o composto 4B é capaz de reduzir a translocação de NF κ B para o interior do núcleo da célula, capacidade demonstrada também por sua capacidade de reduzir a fosforilação da proteína inibidora de NF κ B (I κ B- α), impedindo sua degradação. A manutenção de NF κ B citoplasmático sabidamente reduz a transcrição de diversos genes, incluindo o gene de TNF- α . 4B também foi responsável pela diminuição da expressão de p38-MAPK, proteína importante na estabilização do mRNA de TNF- α e também ativada por ligantes de TLR4, demonstrando que as ações de 4B podem atuar tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional. Em conjunto, tais dados corroboram a via de

ação de 4B e projetam possibilidades de alvos específicos para o composto dentro da via de ativação TLR-NFκB.

Em contraste, nossos dados sugerem que 4J não inibe a produção de TNF-α pela inativação da via de NFκB, mas sim por uma via alternativa regulada pelos níveis de mensageiros como cAMP e NO. O tratamento com 4J promove reduções do nível de NO e aumento nos níveis de cAMP, ambos cenários indutores da inibição da produção de TNF-α, provavelmente induzida por ação da proteína PKA. Ainda são desconhecidos os mecanismos regulatórios da inibição de citocinas pró-inflamatórias induzidas por altos níveis de cAMP, bem como desconhece-se também a forma pela qual 4J aumenta os níveis de cAMP. Prováveis alvos são as enzimas adenilato ciclase e fosfodiesterase, responsáveis pelo anabolismo e catabolismo de cAMP, respectivamente. Além disso, 4J pode também atuar regulando fatores de transcrição envolvidos com a produção de NO, como Nrf-2, ou até inibindo a atividade de iNOS.

Observamos também uma relação entre o tratamento com os compostos 4B e 4J e a produção diferencial de citocinas. A produção de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-6 IFN-γ, IL-12p70 e CCL20 foi significativamente alterada pelos tratamentos com os compostos 4B e 4J, sugerindo que 4B e 4J podem inibir a polarização de macrófagos para o perfil M1 como resultado de sua ativação com LPS. Juntamente com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, o tratamento com o composto 4B também levou à indução de um perfil M2, indicando que suas ações se estendem à citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-13, IL-15, IL-22 e IL-33.

A análise dos efeitos protetivos dos compostos 4B e 4J *in vivo* no modelo murino de sepse induzida por LPS mostra que os compostos são capazes de proteger camundongos dos efeitos da dose letal de LPS, aumentando sua sobrevivência sem, aparentemente causarem danos ou redução da sobrevivência pela aplicação dos compostos em si. Tal fato, corrobora os resultados obtidos *in vitro*, visto que durante a sepse encontram-se níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, levando à reação exacerbada à infecção e, conseqüentemente, morte. A manutenção dos efeitos do tratamento com os compostos 4B e 4J *in vivo* é característica chave para o prosseguimento dos estudos.

Neste trabalho apresentamos uma proposta para o funcionamento da inibição de TNF-α por dois derivados de imidazopiridinas, 4B e 4J nos modelos de ativação de

monócitos e macrófagos por LPS, bem como no modelo animal de sepse. O desenvolvimento e avaliação da atividade anti-inflamatória da primeira geração de IMPs abre as portas para mais estudos sobre a eficiência, os mecanismos de funcionamento e para o desenho racional da próxima geração de fármacos baseadas em núcleos de imidazopiridinas. Mais estudos são imprescindíveis para o progresso no desenvolvimento de drogas inibidoras de TNF- α que tenham maior sucesso/eficiência e produzam menos efeitos adversos do que as disponíveis atualmente no mercado.

8. PERSPECTIVAS

Diante da necessidade de mais estudos envolvendo derivados de imidazopiridinas e a regulação da produção de citocinas e da resposta inflamatória, temos como perspectivas:

- Distinguir por qual dos diferentes mecanismos (apoptose, necrose, etc.), os derivados de imidazopiridinas levam à morte celular;
- Identificar outros possíveis componentes da via de ativação de NFκB que sejam afetados pelo tratamento com o composto 4B, a fim de caracterizar seu mecanismo de ação;
- Identificar por quais vias e/ou moléculas o composto 4J é capaz de regular a produção dos mensageiros cAMP e NO, caracterizando seu mecanismo de ação e definindo em quais pontos da relação NO-cAMP-TNF-α 4J realmente atua;
- Verificar a produção do mRNA de TNF-α, bem como de outras citocinas, com uso dos compostos 4B e 4J
- Avaliar a sinergia do tratamento conjunto com os derivados 4B e 4J
- Avaliar se os efeitos dos compostos 4B e 4J são mantidos em outras células do sistema imune;
- Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* dos compostos 4B e 4J sobre outros modelos de doenças inflamatórias crônicas;
- Utilizar os dados aqui apresentados com o intuito de desenhar uma próxima geração de derivados de imidazopiridinas, com maior eficiência e menos efeitos adversos

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nature Immunology**, v. 8, p. 639-46, 2007.

ABRAHAM, E. et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. **Lancet**, v. 351, p. 929, 1998.

AGGARWAL, B. B., MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin: production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259(1), p. 686-691, 1984.

AGGARWAL, B. B. et al. Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260(4), p. 2345-2354, 1985.

AGGARWAL, B. B. et al. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260(4), p. 2334-234, 1985.

AGGARWAL, B. B. et al. Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. **Ciba Found Symposium**, v. 131, p. 39–51, 1987.

AGGARWAL, B. B. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3(9), p. 745-756, 2003.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, p. 651-665, 2012.

AGTERESCH, H. J et al. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, p. 211, 1999.

AIKAWA, N. E. et al. Immunogenicity of Anti- TNF-alpha agents in autoimmune diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 38, p. 82-9, 2010.

AIKAWA, N. et al. A phase II study of polyclonal anti-TNF- α (AZD9773) in Japanese patients with severe sepsis and/or septic shock. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, p. 931–940, 2013.

AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Pro-inflammatory and pro-apoptotic responses of TNF- α stimulated bovine mammary endothelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 140, p. 282–90, 2011.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 499–511, 2004.

ALEXOPOULOU, L.; PASPARAKIS, M.; KOLLIAS, G. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. **European Journal of Immunology**, v. 27, p. 2588–2592, 1997.

ALLEZ, M. et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: definitions, frequency and pharmacological aspects. **Journal of Crohn's & Colitis**, v. 4, p. 355-66, 2010.

ANDREAKOS, E. T. et al. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 299-313, 2002.

ANEL, R.; KUMAR, A. Human endotoxemia and human sepsis: limits to the model. **Critical Care**, v. 9, p.151– 152, 2005.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v.29, p. 1303–1310, 2001.

AREFIAN, H. et al. Hospital-related cost of sepsis: A systematic review. **Journal of Infection**, v. 74, p. 107-117, 2017.

AREND, W. P.; DAYER, J. M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 38, p. 151–160, 1995.

ARNETT, H. A. et al. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. **Nature Neurosciences**, v. 4, p. 1116–1122, 2001.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Analysis of cytokine expression in dermatology. **Archives of Dermatology**, v. 138, p. 1189–1196, 2002.

ASHWELL, M. A. et al. Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5- b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: Orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 5291–5310, 2012.

ATSUMI, T. et al. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. **The Journal of Immunology**, v.179, p.5399–5406, 2007.

ATZENI, F. et al. Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, p. 703-8, 2013.

AUJLA, S. J.; KOLLS, J. K. IL-22: a critical mediator of mucosal host defence. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, p. 451-454, 2009.

AUSTGULEN, R. et al. Role of monocyte cytotoxic factor in cytolysis of actinomycin D-treated WEHI 164 cells mediated by freshly isolated human adherent mononuclear blood cells. **Cancer Research**, v. 46, p. 4566-70, 1986.

BAGDI, A. K. et al. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines: a decade update. **Chemical Communications**, v. 51, p. 1555-1575, 2015.

BALDARI, C. T. et al. Anthrax toxins: A paradigm of bacterial immune suppression. **Trends in Immunology**, v. 27, p. 434–440, 2006.

BALDWIN, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 649–683, 1996.

BALKWILL, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Review**, v. 25(3), p. 409-416, 2006.

BELISLE, S. E. et al. Genomic profiling of tumor necrosis factor alpha (TNF- alpha) receptor and interleukin-1 receptor knockout mice reveals a link between TNF-alpha signaling and increased severity of 1918 pandemic influenza virus infection. **Journal of Virology**, v. 84, p.12576–88, 2010.

BELL, K. F. et al. Activation of Nrf2-regulated glutathione pathway genes by ischemic preconditioning. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, p. 689524, 2011.

BENDTZEN, K. Anti-TNF-alpha biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine. **Immunotherapy**, v. 4, p. 1167-79, 2012.

BENDTZEN, K. Personalized medicine: theranostics (therapeutics diagnostics) essential for rational use of tumor necrosis factor-alpha antagonists. **Discovery Medicine**, v. 15, p. 201-11, 2013.

BENDTZEN, K. Immunogenicity of Anti-TNF-alpha Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 109, 2015.

BERNARD, G. R. et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 699-709, 2001.

BEUTLER, B. et al. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v. 232, p. 977–980, 1986.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, v. 320, p. 584-8, 1986.

BEUTLER, B.; MILSARK, I. W.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. **Journal of Immunology**, v. 135(6), p. 3972–3977, 1985.

BEUTLER, B.; MILSARK, I. W.; CERAMI, A. C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. **Science**, v. 229, p. 869–71, 1985.

BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, B. B. Receptor-mediated choreography of life and death. **Journal of Clinical Immunology**, v. 23(5), p. 317-332, 2003.

BIGGS-HOUCK, J. E.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. **Current Opinions in Chemical Biology**, v. 14, p. 371-382, 2010.

BIGINELLI, P. Aldehyde-Urea Derivatives of Aceto- and Oxaloacetic Acids. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 23, p. 360-413, 1893.

BINGOLD, T. M. et al. Interleukin-22 detected in patients with abdominal sepsis. **Shock**, v. 34, p. 337-340, 2010.

SHOCK, Vol. 34, No. 4, pp. 337Y340, 2010

BLACK, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature** v. 385, p. 729–33, 1995.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, p. 110–117, 1996.

BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular Toll-like receptors. **Immunity**, v. 32, p. 305-15, 2010.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine**. *Chest*, v.101, p.1644–1655, 1992.

BORCHERS, A. T. et al. Immune-mediated adverse effects of biologicals used in the treatment of rheumatic diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 37, p. 273-88, 2011.

BORDEN, E. C.; CHIN, P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 123, p. 824-829, 1994.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 460–475, 2003.

BOTTAÏ, T. et al. An imidazopyridine anxiolytic alters glucose tolerance in patients: a pilot investigation. **Clinical Neuropharmacology**, v. 18, p. 79-82, 1995.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 149-60, 2008.

BREKKE, O. H.; SANDLIE, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 52-62, 2003.

BRIETZKE, E.; KAPCZINSKI, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32(6), p.1355-1361, 2008.

BRINGMAN, T. S.; AGGARWAL, B. B. Monoclonal antibodies to human tumor necrosis factors alpha and beta: application for affinity purification, immunoassays, and as structural probes. **Hybridoma**, v. 6(5), p. 489-507, 1987.

BRYN, T. et al. The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 7361–7370, 2006.

BURCHARDI, H.; SCHNEIDER, H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. **Pharmacoeconomics**, v.22, p. 793–813, 2004.

CALANDRA, T. et al. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon- γ , and interferon- γ in the serum of patients with septic shock. **Journal of Infectious Diseases**, v.161, p. 982–987, 1990.

CANNON, J. et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 79–84, 1990.

CAPURON, L.; MILLER, A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacology and Therapeutics**, v.130, p.226–238, 2011.

CAR, B. D. et al. Interferon γ receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. **Journal of Experimental Medicine**, v.179, p.1437–1444,1994.

CAREY, M. The enhanceosome and transcriptional synergy. **Cell**, v. 92, p. 5–8, 1998.

CARTER, P. H. et al. Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF-alpha. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, p. 11879–84, 2001.

CASTELLHEIM, A. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, p. 479-91, 2009.

CAUX, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1263– 1272, 1994.

CAVAILLON, J. M. et al. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, p. 311–20, 2005.

CHALUPKA, A. N.; TALMOR, D. The economics of sepsis. **Critical Care Clinics**, v.28, p. 57–76, 2012.

CHAPMAN, A. P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 531-45, 2002.

CHAUDRY, H. et al. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. **In vivo**, v. 27, p. 669-684, 2013.

CHEN, G. et al. Synthesis and Anti-inflammatory Evaluation of Novel Benzimidazole and Imidazopyridine Derivatives. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, p. 69-74, 2013.

CHENG, Y. Bactericidal activity of an imidazo[1, 2-a]pyridine using a mouse M. tuberculosis infection model. **PLoS One**, v. 9, e87483, 2014.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, p. 885–891, 2002.

COLLIGHAN, N. et al. Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. **The British Journal of Surgery**, v. 91, p. 762-8, 2004.

COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 2243-2247, 1993.

CUI, X. et al. Bacillus anthracis cell wall produces injurious inflammation but paradoxically decreases the lethality of anthrax lethal toxin in a rat model. **Intensive Care Medicine**, v. 36, p.148–56, 2010.

- CULLEN, K. A. et al. Activation of cAMP-guanine exchange factor confers PKA-independent protection from hepatocyte apoptosis. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, p. 334-43, 2004.
- CUSCHIERI, J.; MAIER, R. V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Critical Care Medicine**, v. 33, p. S417-9, 2005.
- DA MOTA, L. M. et al., 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, p. 152-74, 2012.
- DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. **Cancer Research**, v. 44, p. 83-90, 1984.
- DELLINGER, R. P.; CARLET, J. M.; MASURETAL, H. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, p. 858–873, 2004.
- DELLINGER, R. P. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v.41, p. 580–637, 2013.
- DENK, S.; PERL, M.; HUBER-LANG, M. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis? **European Surgical Research**, v.48, p. 171–179, 2012.
- DEROOSE, J. P. et al. Long-term results of tumor necrosis factor α - and melphalan-based isolated limb perfusion in locally advanced extremity soft tissue sarcomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29(30), p. 4036-4044, 2011.
- DEROOSE, J. P. et al. 20 years experience of TNF-based isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: TNF dose matters. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, p. 627-635, 2012.
- DIAO, H.; KOHANAWA, M. Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. **Infection and Immunology**, v. 73, p. 3745-8, 2005.

DINARELLO, C. A. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 164, p. 1443–50, 1986.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407, 1988.

DOMBROVSKIY, V.Y. et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. **Critical Care Medicine**, v.35 p. 1244–1250, 2007.

DOMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and biology of multicomponent reactions. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3083-3135, 2012.

DONG, R. et al. Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1071–8, 2007.

DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 67(5), p. 446-457, 2010.

DREDGE, K.; MARRIOTT, J. B.; DALGLEISH, A. G. Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. **Critical Reviews in Immunology**, v. 22, p. 425–437, 2002.

DUHE, R. J. et al. Oxidation of critical cysteine residues of type 1 adenylyl cyclase by O iodobenzoate or nitric acid reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 7290–7296, 1994.

DYMIŃSKA, L. Imidazopyridines as a source of biological activity and their pharmacological potentials-Infrared and Raman spectroscopic evidence of their content in pharmaceuticals and plant materials. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 6087, 2015.

ECHTENACHER, B. et al. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 3550–5, 2001.

EIGLER, A. et al. Anti-inflammatory activities of cAMP- elevating agents: Enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. **Journal of Leukocyte. Biology**, v. 63, p. 101-7, 1998.

EL-SAYED, W. M. et al. The position of imidazopyridine and metabolic activation are pivotal factors in the antimutagenic activity of novel imidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 715, p. 212, 2013.

ELLIOTT, M. J. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, p.1681-90, 1993.

EMERY, P. Optimizing outcomes in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to anti-TNF treatment. **Rheumatology**, v. 51, p. v22-30, 2012.

ENDRES, S. et al. Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear cells. **Immunology**, v. 72, p. 56-60, 1991.

ERMERT, M. et al. In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. **Cytokine**, v. 22, p. 89–100, 2003.

ESKANDARI, M. K.; BOLGOS, G.; MILLER, C. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 2724–30, 1992.

ESTAQUIER, J. et al. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1759–1767, 1995.

EVANS, T. J. et al. Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 2173–2179, 1994.

FALVO, J. V.; TSYTSYKOVA, A. V.; GOLFDIELD, A. E. Transcriptional control of the TNF gene. **Current Directions in Autoimmunity**, v. 11, p; 27-60, 2010.

FEDERAL DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry. Assay development for immunogenicity testing of therapeutic proteins 2009. Available from: (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/./Guidances/UCM192750.pdf>), 2009.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 163–196, 2001.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. **Joint Bone Spine**, v. 69, p. 12–18, 2002.

FELDMANN, M. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 1–27, 2009.

FENG, S. et al. Discovery of Imidazopyridine Derivatives as Highly Potent Respiratory Syncytial Virus Fusion Inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 359-362, 2015.

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, p. 3815–3822, 1991.

FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, p. 259-72, 2016.

FOLKS, T. M. et al. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 86, p. 2365–2368, 1989.

FÖRSTERMANN, U. et al. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Advances in Pharmacology**, v. 34, p. 171–186, 1995.

FÖRSTERMANN, U. et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, p. 1321, 1995.

FOXWELL, B. et al. Efficient adenoviral infection with I κ B α reveals that macrophage tumor necrosis factor α production in rheumatoid arthritis is NF- κ B dependent.

Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v. 95, p. 8211–8215, 1998.

FUGGER, R. et al. Perioperative TNF alpha and IL-6 concentrations correlate with septic state, organ function, and APACHE II scores in intra-abdominal infection. **European Journal of Surgery**, v. 159 p. 525–9, 1993.

FURUKAWA, S. et al. Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. **Scientific Reports**, v. 7, 42413, 2017.

FUSS, I. J.; STROBER, W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. **Mucosal Immunology**, v. 1, p. S31-S33, 2008.

GALLAGHER J. et al. A multi- center, open-label, prospective, randomized, dose-ranging pharmacokinetic study of the anti-TNF-a antibody afelimomab in patients with sepsis syndrome. **Intensive Care Medicine**, v. 27, p. 1169–78, 2001.

GARCES, S.; DEMENGEOT, J.; BENITO-GARCIA, E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta- analysis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, p. 1947-55, 2013.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, p. 385–388, 1988.

GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 66(8), p. 1403-1408, 2003.

GERMAIN, R. N. Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology. **Nature Immunology**, v.13, p.902–906, 2012.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word ‘sepsis’. **Intensive Care Medicine**, v.32, p. 2077, 2006.

GHEZZI P; CERAMI A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. **Molecular Biotechnology**, v. 31, p. 239-44, 2005.

- GILL, G. N.; GIM, W. Assay for cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Advances in Cyclic Nucleotide Research**, v. 10, p. 93–106, 1979
- GOLDFELD, A. E.; MANIATIS, T. Coordinate viral induction of tumor necrosis factor α and interferon β in human B cells and monocytes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 86, p. 1490–1494, 1989.
- GOLDFELD, A. E.; STROMINGER, J. L., DOYLE, C. Human tumor necrosis factor α gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 73-81, 1991.
- GOLDFELD, A. E. et al. Transcription of the tumor necrosis factor α gene is rapidly induced by anti-immunoglobulin and blocked by cyclosporin A and FK506 in human B cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 89, p. 12198–12201, 1992.
- GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. **Nature**, v. 346, p. 274–276, 1990.
- GOUEL-CHERON, A. et al. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: A powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. **PloS One**, v. 7, e33095, 2012.
- GRELL, M. et al. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, p. 570–575, 1998.
- GRICE, C. A. et al. Identification of a potent, selective, and orally active leukotriene a4 hydrolase inhibitor with anti-inflammatory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 4150–4169, 2008.
- GRIVENNIKOV, et al. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: from simple paradigms to complex mechanisms. **International Review of Cytology**, v. 252, p. 129–161, 2006.
- GRUNHAGEN, D. J. et al. Isolated limb perfusion with TNF-alpha and melphalan in locally advanced soft tissue sarcomas of the extremities. **Recent Results in Cancer Research**, v. 179, p. 257-270, 2009.

GUO, W. et al. Acid/base-controlled chemodivergent synthesis of two differently functionalized tetrahydroimidazo [1,2-a]pyridines. **RSC Advances**, v. 5, p. 70429-32, 2015.

GUTTRIDGE, D. C. et al. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 5785–5799, 1999.

HAN, J. et al. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 25009–25014, 1993.

HANSEN, J. D.; VOJTECH, L. N.; LAING, K. J. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 886–897, 2011.

HARANAKA, K. et al. Purification, characterization, and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 83, p. 3949–3953, 1986.

HAUSMANN, O. V. et al. The complex clinical picture of side effects to biologicals. **Medical Clinics of North America**, v. 94, p. 791-804, 2010.

HAYASHI, K. et al. A systems biology approach to suppress TNF-induced proinflammatory genes expressions. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, p. 84, 2013.

HE, M. M. et al. Small-molecule inhibition of TNF-alpha. **Science**, v. 310, p. 1022–5, 2005.

HEINE, H. et al. Lipopolysaccharide-induced change of phosphorylation of two cytosolic proteins in human monocytes is prevented by inhibitors of ADP-ribosylation. **Journal of Immunology**, v. 155, p. 4899, 1995.

HEINZEL, F. P. The role of IFN-γ in the pathology of experimental endotoxemia. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 2920–2924, 1990.

HIGUCHI, M. et al. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I- infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation- characterization of membrane TNF-a. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 82, p. 133–40, 1997.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 86, 2013.

HONERJÄGER, P. et al. Imidazopyridines: roles of pyridine nitrogen position and methylsulfinyloxygen for in vitro positive inotropic mechanism and chronotropic activity. **Cardiovascular Pharmacology**, v. 13, p. 673-681, 1989.

HOOK, K. M.; ABRAMS, C. S. The loss of homeostasis in hemostasis: new approaches in treating and understanding acute disseminated intravascular coagulation in critically ill patients. **Clinical and Translational Science**, v.5, p.85– 92, 2012.

HORINO, T. et al. Interleukin-1-deficient mice exhibit high sensitivity to gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Cytokine**, v. 30, p. 339-46, 2005.

HOTCHKISS, R. S.; OPAL, S. Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. **The New England Journal of Medicine**, v.363, p.87–89, 2010.

HOWARD, M. et al. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **Journal of Experimental Medicine**, v.177, p.1205–1208,1993.

HSU, H. et al. TRADD- TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. **Cell**, v. 84(2), p. 299-308, 1996.

HUANG, S. et al. Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. **Science**, v. 259, p. 1742-1745, 1993.

HUBER, R. et al. TNF Tolerance in monocytes and macrophages: characteristics and molecular mechanisms. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.

IGNARRO, L. J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. **Pharmacology & Toxicology**, v. 67, p. 1–7, 1990

IKUTA, T. et al. A common signaling pathway is activated in erythroid cells expressing high levels of fetal hemoglobin: a potential role for cAMP-elevating agents in β -globin disorders. **Journal of Blood Medicine**, v. 4, p. 149-59, 2013.

INGERSOLL, M. A. et al. Novel Imidazopyridine Derivatives Possess Anti-Tumor Effect on Human Castration- Resistant Prostate Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, e0131811, 2015.

INOUE, S. et al. IL-15 Prevents Apoptosis, Reverses Innate and Adaptive Immune Dysfunction, and Improves Survival in Sepsis. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 1401-1409, 2010.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Factor**, v. 13, p. 357-368, 2002.

JACOBS, M. et al. Reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization. **European Cytokine Network**, v. 18, p. 5–13, 2007.

JADALI, Z.; AMIRI, M. M.; RAVANBAKHS, M. Apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with sepsis. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 53, p. 646–50, 2010.

JANEWAY, C. A. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. **Garland Science**, 2001.

JANSEN, P. M. et al. Release of interleukin-12 in experimental Escherichia coli septic shock in baboons: relation to plasma levels of interleukin-10 and interferon- γ . **Blood**, v.87, p.5144–5151,1996.

JELINEK, D. F.; LIPSKY, P. E. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- α and interleukin 1. **Journal of Immunology**, v. 139, p. 2970–6, 1987.

JONES, P. T. et al. Replacing the complementarity- determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, v. 321, p. 522-5, 1986.

JOSE, G. et al. Synthesis, molecular docking and anti-mycobacterial evaluation of new imidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 616-27, 2015.

JOSEPHS, M. D. et al. Lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced hepatic injury is mediated by TNF- α and not by Fas ligand. **American Journal of Physiology**.

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 278, p. R1196–R1201, 2000.

JUNGER, W.G. et al. Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. **Journal of Trauma**, v. 40, p. 702–709, 1996.

KAMBAYASHI, T. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 155, p. 4909, 1995.

KAUR, H.; HALLIWELL, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. **FEBS Letters**, v. 350, p. 9–12, 1994.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KEHRL, J. H.; MILLER, A.; FAUCI, A. S. Effect of tumor necrosis factor- α on mitogen-activated human B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, p. 786–91, 1987.

KELKER, H. C. et al. Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin. **International Journal of Cancer**, v. 36(1), p. 69-73, 1985.

KELLUM, J. A.; DECKER, J. M. The immune system: relation to sepsis and multiple organ failure. **AACN Clinical Issues**, v. 7, p. 339–350, 1996.

KELLUM, J. A. et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: Results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. **Archives of International Medicine**, v. 167, p. 1655+1663, 2007.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? **Carcinogenesis**, v. 31, p. 90–99, 2010.

KEYSTONE, E. C. et al. Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, p. 353-63, 2004.

KISHORE, R. et al. Lipopolysaccharide-mediated signal transduction: Stabilization of TNF-alpha mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha

production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. **Comparative Hepatology**, v. 3, p. S31, 2004.

KITAGAWA, Y. et al. Inhibition of CCL20 increases mortality in models of mouse sepsis with intestinal apoptosis. **Surgery**, v. 154, p. 78-88, 2013.

KLUG, S. et al. Embryotoxic effects of thalidomide derivatives in the non-human primate *Callithrix jacchus*. 5. Lack of teratogenic effects of phthalimidophthalimide. **Archives of Toxicology**, v. 68, p. 203–205, 1994.

KOHASE, M. et al. Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. **Cell**, v. 45, p. 659–66, 1986.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-7, 1975.

KOPF, M. et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, p. 339-342, 1994.

KOPPERUD, R. et al. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. **FEBS Letters**, v. 546, p. 121-6, 2003.

KRIEGLER, M. et al. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. **Cell**, v. 53, p. 45–53, 1988.

KUMAR A. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 1589-96, 2006.

KUMAR, A. T. et al. Cytokine profile in elderly patients with sepsis. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 13, p. 74-78, 2009.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**, v. 221, p. 220–235, 1995

KUSTERS, S. et al. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. **European Journal of Immunology**, v. 27, p. 2870–2875, 1997.

- LA-ROSA, F. A.; PIERCE, J. W.; SONENSHEIN, G. E. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 1039-1044, 1994.
- LACERDA, R. B. et al. Novel potent imidazo[1,2-a]pyridine-N-glyciny-hydrazone inhibitors of TNF- α production: In Vitro and in Vivo studies. **PLoS One**, v. 9, p. 1-10, 2014.
- LANDER, H. M. et al. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 159-1516, 1993.
- LANDER, H. M. et al. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21rai. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 7017–7020, 1995.
- LATIFI, S. Q.; O'RIORDAN, M. A.; LEVINE, A. D. Interleukin- 10 controls the onset of irreversible septic shock. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4441–4446, 2002.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, p. Epub 2009, Oct. 7, 2009.
- LEENTJENS, J. et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo- controlled, randomized pilot study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 196, p. 838-845, 2012.
- LE BORGNE, M. et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. **Immunity**, v. 24,p. 191-201, 2006.
- LE-PAGE, C. et al. Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, p. 451, 1998.
- LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Inflammation and coagulation. **Critical Care Medicine**, v. 38, p. S26–S34, 2010.
- LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. **Critical Care Medicine**, v.31, p. 1250–1256, 2003.

LIM, C. A. et al. Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF- κ B upon TLR4 activation. **Molecular Cell**, v. 27, p. 622–635, 2007.

LORENTE, J. A.; MARSHALL, J. C. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. **Shock**, v. 24, p. 107–19, 2005.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G. E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 810–820, 2001.

LUCAS, M. et al. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. **Immunity**, v. 26, p. 503–517, 2007.

LUKASZEWICZ, M.; MROCKZO, B.; SZMITKOWSKI, M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 117, p. 247-251, 2007.

LUO, W. et al. Interleukin-22 promotes macrophage M2 polarization via STAT3 pathway. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, p. 19574-19580, 2016.

LV, S. et al. Anti-TNF- α therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. **International Journal of Clinical Practice**, v. 68, p. 520-528, 2014.

MA, L. et al. A novel small-molecule tumor necrosis factor α inhibitor attenuates inflammation in a hepatitis mouse model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 12457–66, 2014.

MAINI, R. N. et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, p. 1552, 1998.

MALEFYT, R. D. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.174, p. 1209–1220, 1991.

MALVIYA, G. et al. Biological therapies for rheumatoid arthritis: progress to date. **BioDrugs**, v. 27, p. 329-45, 2013.

MARINO, M. W. et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, p. 8093–8098, 1997.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v.348, p. 1546–1554, 2003.

MATSUKAWA, A. et al. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 2738-2744, 2000.

MERA, S. et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. **APMIS**, v. 119, p. 155-163, 2011.

MERIKA, M.; THANOS, D. Enhanceosomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, p. 205–208, 2001.

MINTY, A. et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, v. 362, p. 248-50, 1993.

MIRCHANDANI, A. S.; SALMOND, R. J.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. **Trends in Immunology**, v. 33, p. 389–396, 2012.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 240-272, 2009.

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Annals of Medicine**, v. 27, p. 359-367, 1995.

MONACO, C. et al. Anti-TNF therapy: past, present and future. **International Immunology**, v. 27, p. 55-62, 2014.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, p. 164, 1999.

MONTI, J. M. et al. Zolpidem's use for insomnia. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 25, p. 79-90, 2017.

MOORE, A. R.; WILLOUGHBY, D. A. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 101, p. 387, 1995.

- MOORE, R. J. et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. **Nature Medicine**, v. 5(7), p. 828- 831, 1999.
- MORENO, S. E. et al. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Journal of Immunology**, v.177, p.3218–3224, 2006.
- MORGAN, M. J; LIU, Z. G. Reactive oxygen species in TNF α -induced signaling and cell death. **Molecules and Cells**, v. 30(1), p. 1-12, 2010.
- MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 81, p. 6851-5, 1984.
- MOSS, M. L. et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . **Nature**, v. 385, p. 733–736, 1997.
- MOTEGI, A. et al. IL-15-induced CD8+CD122+ T cells increase antibacterial and anti-tumor immune responses: implications for immune function in aged mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 1047–1056, 2008.
- MÜHL, H. et al. Nitric oxide augments release of chemokines from monocytic U937 cells: modulation by anti-inflammatory pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 969-80, 2000.
- MURASHIMA, Y. L.; SUZUKI, J.; YOSHII, M. Role of cytokines during epileptogenesis and in the transition from the interictal to the ictal state in the epileptic mutant EL mouse. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 2, p. 267-274, 2008.
- MUSTAFA, S. B.; OLSON, M. S. Expression of nitric-oxide synthase in rat Kupffer cells is regulated by cAMP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 5073, 1998.
- NAGATSU, T.; SAWADA, M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11(8), p. 999-1016, 2005.
- NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NK-kB signaling. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, p. 443-68, 2013.

NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nature Communications**, v. 8, 14919, 2017.

NATANSON, C.; ESPOSITO, C. J.; BANKS, S. M. The sirens' songs of confirmatory sepsis trials: selection bias and sampling error. **Critical Care Medicine**, v. 26, p. 1927–31, 1998.

NAWROTH, P. P. et al. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, p. 1363–75, 1986.

NEUMANN, M. et al. RelA/ p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. **EMBO**, v. 14, p. 1991, 1995.

NIKOLIC-PATERSON, D. J.; WANG, S.; LAN, H. Y. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. **Kidney International Supplements**, v. 4, p. 34-38, 2011.

O'CONNELL, M. A. et al. Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 30410–30414, 1998.

O'MALLEY, W. E. Action of bacterial polysaccharide on tumors: II. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance; **Journal of the National Cancer Institute**, v. 29, p. 1169-1175, 1962.

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 353–64, 2007.

OLLIVIER, V. et al. Elevated cyclic AMP inhibits NF- κ B-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 20828-35, 1996.

OLSSON, I. et al. Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine. *Eur J Haematol* 42: 270–275, 1989.

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF- α : the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2(9), p. 736-746, 2003.

- PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664–666, 1988.
- PALOMBELLA, V. J.; MENDELSON, J.; VILCEK, J. Mitogenic action of tumor necrosis factor in human fibroblasts: interaction with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. **Journal of Cellular Physiology**, v. 135, p. 23–31, 1988.
- PANACEK, E. A. et al. Monoclonal anti-TNF: a Randomized Controlled Sepsis Study Investigators. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. **Critical Care Medicine**, v. 32, p. 2173–82, 2004.
- PAORILLO, J. E. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, p. 227–42, 1990.
- PAPATHANASIOU, S. et al. Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. **Nature Medicine**, v. 21, p. 1076–1084, 2015.
- PARK, S. H. et al. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. **Nature Immunology**, v. 12, p. 607–615, 2011.
- PATTERSON, C. C. et al. The associations of interleukin-6 (IL-6) and downstream inflammatory markers with risk of cardiovascular disease: The caerphilly study. **Atherosclerosis**, v. 209, p. 551–557, 2010.
- PENNICA, D. et al. Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 82, p. 6060–6064, 1985.
- PERKINS, N. D. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 1433–1448, 1997.
- PESCHON, J. J. et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**, v. 282, p. 1281–1284, 1998.

PFEFFER, K. et al. Mice deficient for the 55 kDa tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**, v. 73(3), p. 457–467, 1993.

PFUNTNER, A.; WIER, L. M.; STEINER, C. Costs for Hospital Stays in the United States, 2010. HCUP Statistical Brief #146. **Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD, 2013.** (<http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb146.pdf>)

PHILIP, R.; EPSTEIN, L. B. Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. **Nature**, v. 323, p. 86–9, 1986.

PORDEL, M. et al. New fluorescent heterocyclic systems from imidazo [1, 2-a] pyridine: Design, synthesis, spectral studies and quantum-chemical investigations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1129, p. 105, 2017.

PRABHAKAR, U. et al. Characterization of cAMP-dependent inhibition of LPS-induced TNF α production by rolipram, a specific phosphodiesterase IV (PDE IV) inhibitor. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 16, p. 805–816, 1994.

PRADO, et al. Biological anti-TNF drugs: immunogenicity underlying treatment failure and adverse events. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, p. 985-995, 2017.

PREISER, J. et al. Interleukin- 6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effect in the dog. **Cytokine**, v. 3, p. 1-4, 1991.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, v. 302, p. 2–22, 2015.

QI, F. et al. Respiratory macrophages and dendritic cells mediate respiratory syncytial virus-induced IL-33 production in TLR3- or TLR7-dependent manner. **International Immunopharmacology**, v. 29, p. 408-415, 2015.

QIAN, Y. et al. Inhibition of inflammation and oxidative stress by an imidazopyridine derivative X22 prevents heart injury from obesity. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, p. 1427-42, 2016.

RAJKUMAR, S. V. Current status of thalidomide in the treatment of cancer. **Oncology**, v. 15, p. 867–874, 2001.

RAMALINGAM, T. R. et al. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor alpha1 chain. **Nature Immunology**, v. 9, p. 25-33, 2008.

RAU, R. Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, p. ii70-3, 2002.

REINHART, K. et al., Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. **Critical Care Medicine**, v. 24, p. 733-42, 1996.

REINHART, K. et al., Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. **Critical Care Medicine**, v. 29, p. 765– 9, 2001.

REINSTEIN, L. J. et al. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated release of tumor necrosis factor by adenosine: evidence for A2 receptors on rat Kupffer cells. **Hepatology**, v. 19, p. 1445, 1994.

REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 13, p. 110–16, 2000.

RHEE, C. et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. **JAMA**, v. 318, p. 1241-49, 2017.

RICE, T. W. et al. Safety and efficacy of affinity-purified, anti-tumor necrosis factor-alpha, ovine fab for injection (CytoFab) in severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 2271–81, 2006.

RIVERS, E. et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v.345, p. 1368–1377, 2001.

ROACH, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v. 168(9), p. 4620–4627, 2002.

ROBINSON, W. H.; GENOVESE, M. C.; MORELAND, L. W. Demyelinating and neurologic events reported in association with tumor necrosis factor α antagonism: by what mechanisms could tumor necrosis factor α antagonists improve rheumatoid arthritis but exacerbate multiple sclerosis? **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, p. 1977–1983, 2001.

ROMERO, C. R. et al. The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 725-35, 2010.

ROTHER, J. et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. **Nature**, v. 364(6440), p. 798–802, 1993.

ROTHER, M. et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumour necrosis factor receptor. **Cell**, v. 78, p. 681–92, 1994.

ROTHER, M. et al. TRAF2 mediated activation of NF- κ B by TNF receptor-2 and CD40. **Science**, v. 269, p. 1424-7, 1995.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 320–344, 2004.

ROY, C. R.; MOCARSKI, E. S. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. **Nature Immunology**, v. 8, p. 1179–1187, 2007.

RUSSEL, J. A. et al. Molecular mechanisms of sepsis. **Sepsis - Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Responses**, v. 17, p. 48-85, 2011.

SAITO, S.; MATSUURA, M.; HIRAI, Y. Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-12 Production by Activation of Repressor Element GA-12 through Hyperactivation of the ERK Pathway. **American Society for Microbiology**, v. 13, p. 876-883, 2006.

SAYED, B. A. et al. Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? **Journal of Immunology**, v. 184(12), p. 6891-6900, 2010.

SCHULZE-OSTHOFF, K. et al. Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. **Immunobiology**, v. 198, p. 35-49, 1997.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, B; BUCALA, R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets - An Updated View. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, ID 165974, 2013.

SECKINGER, P.; ISAAZ, S.; DAYER, J. M. A human inhibitor of tumor necrosis factor alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 1511–1516, 1988.

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, p. 453-472, 2014.

SELDON, P. M. et al. Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase. **Molecular Pharmacology**, v. 48, p. 747–757, 1995.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. TNF: A master switch for inflammation to cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 5094–5107, 2008.

SHAKHOV, A. N., et al. κ B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, p. 35–47, 1990.

SHALABY, M. R. et al. Endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 53, p. 488–98, 1989.

SHAMES, B. et al. Suppression of Tumor Necrosis Factor- α production by cAMP in human monocytes: dissociation with mRNA level and independent of Interleukin-10. **Journal of Surgical Research**, v. 99, p. 187–193, 2001.

SHARMA, V. K.; DELLINGER, R. P. Treatment options for severe sepsis and septic shock. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 4, p. 395–403, 2006.

SHEAR, M. J.; PERRAULT, A. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to the injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 4, p. 461–8, 1944.

SHIBUKI, K.; OKADA, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. **Nature**, v. 349, p. 326–328, 1991.

SHIKAMA, Y.; YAMADA, M.; MIYASHITA, T. Caspase-8 and caspase-10 activate NF- κ B through RIP, NIK and IKK α kinases. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 1998–2006, 2004.

SMITH, C. A. et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. **Science**, v. 248(4958), p. 1019–1023, 1990.

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION. Publication number WO1993014081 A1, 1993.

SPINA, D. Theophylline and PDE4 inhibitors in asthma. **Current Opinions in Pulmonary Medicine**, v. 9, p. 57–64, 2003.

SPOONER, C. E.; MARKOWITZ, N. P.; SARAVOLATZ, L. D. The role of tumor necrosis factor in sepsis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. S11-7, 1992.

SPRINGETT, G. M.; KAWASAKI, H.; SPRIGGS, D. R. Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. **BioEssays**, v. 26, p. 730-8, 2004.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v. 78, p. 931–936, 1994.

STEENBERG, A. et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology**, v. 285, p. 433-437, 2003.

STEINHAUSER, M. L. et al. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. **Journal of Immunology**, v.162, p. 5437–5443, 1999.

STEVENS, S. R.; CHANG, T. H., History of development of TNF inhibitors. **TNF-alpha Inhibitors**, p. 9-22, 2006.

STEWART, A. G.; PHAN, L. H.; GRIGORIADIS, G. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. **Microsurgery**, v. 15, p. 693–702, 1994.

STONE, T. W. et al. Adenosine: some therapeutic applications and prospects. **Pharmacological Sciences: Perspectives for Research and Therapy in the Late 1990s**, p. 303, 1995.

STRIETER, R. M. et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor- α production by pentoxifylline. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, p. 1230-6, 1988.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . **Journal of Immunology**, v. 139, p. 518, 1987.

SUNG, S. S. et al. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 937–953, 1988.

SWARDFAGER, W. et al. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 68(10), p. 930-941, 2010.

TAIMI, M. et al. Effect of retinoic acid and vitamin D on the expression of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor- α and interleukin-6 in the human monocytic cell line U937. **Leukemia Research**, v. 79, p. 229–235, 1993.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 7-11, 2001.

TAKEDA, K. et al. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. **Nature**, v. 323, p. 338-40, 1987.

TAKEUCHI, T. Revolutionary change in rheumatoid arthritis management with biological therapy. **Keio Journal of Medicine**, v. 60, p. 75-81, 2011.

TANAKA, Y. et al. Selective expression of liver and activation regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 633-42, 1999.

TANG, B. M.; HUANG, S. J.; MCLEAN, A. S. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. **Critical Care**, v.14, p. R237, 2010.

TARTAGLIA, L. A. et al. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 88, p. 9292–6, 1991.

THE LENERCEPT MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP AND THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA MS/MRI ANALYSIS GROUP. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. **Neurology**, v. 53, p. 457–465, 1999.

TRACEY, K. J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v. 234, p. 470–4, 1986.

TRACEY, K. J. et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, p. 662–664, 1987.

TRINCHIERI, G. et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin induce differentiation of human myeloid cell lines in synergy with immune interferon. **Journal of Experimental Medicine**, v. 164, p. 1206–25, 1986.

TSAI, E. Y. et al. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor- α gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, p. 5232–44, 1996.

TUOHY, V. K. et al. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Immunological Reviews**, v. 164, p. 93–100, 1998.

UTO, Y. Imidazo[1,2-a]pyridines as cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) inhibitors: a patent evaluation (WO2014061676). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, p. 373-77, 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN BERLO, D. et al. Neutrophil-derived ROS contribute to oxidative DNA damage induction by quartz particles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1685–1693, 2010.

VAN DEN BERG, W. B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Research**, v. 3, p. 18–26, 2001.

VAN DER POLL, T.; VAN DEVENTER, S. J. H. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.13, p. 413–426, 1999.

VAN DER POLL, T. et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1253-1259, 1994.

VAN DER POLL, T. et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **Journal of Immunology**, v. 155, p.5397–5401,1995.

VAN DERVORT, A. L. et al. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF- α production by human neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 4102–4109, 1994.

VAN ZEE, K. J. et al. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 89, p. 4845–4849, 1992.

VARONA, R. et al. CCR6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 37-45, 2001.

VILCEK, J. et al. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, p. 632–43, 1986.

VINCENT, F. B. et al. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, p. 165-78, 2013.

VINCENT, J. L.; SUN, Q.; DUBOIS, M. J. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 1084-93, 2003.

- WAAGE, A.; HALSTENSEN, A.; ESPEVIK, T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. **Lancet**, v. 1, p. 355–357, 1987.
- WAJANT, H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, p. 1727-1741, 2015.
- WALL, E. A. et al. Suppression of LPS-Induced TNF- α Production in Macrophages by cAMP Is Mediated by PKA-AKAP95-p105. **Science Signaling**, v. 2, p. 28, 2009.
- WALLIS, R. S. et al. Reactivation of latent granulomatous infections by infliximab. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p.S194–198, 2005.
- WANG, S. et al. Nitric Oxide Increases Tumor Necrosis Factor Production in Differentiated U937 Cells by Decreasing Cyclic AMP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 5959-65, 1997.
- WANG, Z. et al. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1367-1371, 1994.
- WEBER, G. F. et al. Inhibition of Interleukin-22 Attenuates Bacterial Load and Organ Failure during Acute Polymicrobial Sepsis. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 1690-1697, 2007.
- WEIGHARDT, H. et al. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. **Annals of Surgery**, v. 235, p.560–567, 2002.
- WESCHE-SOLDATO, D. E. et al. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. **Current Drug Targets**, v. 8, p. 493–500, 2007.
- WOLK, K et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defence, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 1309-1323, 2006.
- WU, H. P. et al. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. **Inflammation Research**, v. 58, p. 385+393, 2009.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 425-56, 2003.

XIAO, H.Y. et al. Novel Synthesis of the hexahydroimidazo[1,5b]isoquinoline Scaffold: Application to the Synthesis of Glucocorticoid Receptor Modulators. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 1270, 2010.

XIE, Q-W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kB/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 4705-8, 1994.

YUASA T. et al. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38: germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor inter-acting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273(35), p. 22681-22692, 1998.

ZAKKAR, M. et al. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 29 p. 1851–1857, 2009.

ZARGHI, A.; AZAMI-MOVAHED, M. Design and synthesis of new imidazopyridine derivatives as selective COX-2 inhibitors. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. S531, 2012.

ZENEWICZ, L. A.; FLAVELL, R. A. IL-22 and inflammation: leukin' through a glass onion. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 3265-3268, 2008.

ZENG, L. et al. Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies. **Critical Care**, v. 13, R188, 2009.

ZHANG, Y. H. et al. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibro- blasts: role in the induction of interleukin 6. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 85, p. 6802–5, 1988.

ZHAO, Y. P. et al. Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF- α and β -catenin signalling. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, p. 2244–2253, 2014.

ZHONG, H. et al. The phosphorylation status of nuclear NF-kB determines its association with CBP/p300 or HADAC-1. **Molecular Cell**, v. 9, p. 625-36, 2002.

ZHONG, W. W. et al. Effects of prostaglandin E2, cholera toxin and 8-bromo-cyclic AMP on lipopolysaccharide-induced gene expression of cytokines in human macrophages. **Immunology**, v. 84, p. 446–452, 1995.

ZIDEK, Z. Role of cytokines in the modulation of nitric oxide production by cyclic AMP. **European Cytokine Network**, v. 12, p. 22.32, 2001.

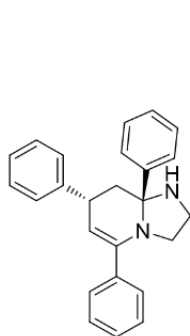
ZIESCHE, E. et al. Dexamethasone suppresses IL-22 associated with bacterial infection in vitro and in vivo. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 370-376, 2009.

ZINETTI, M. et al. Endogenous nitric oxide production by human monocytic cells regulates LPS-induced TNF production. **European Cytokine Network**, v. 6, p. 45–48, 1995.

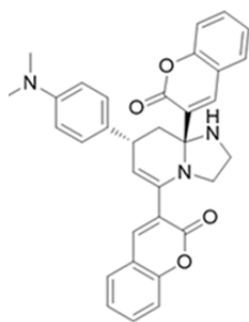
ZISMAN, D. A. et al. Anti- interleukin-12 therapy protects mice in lethal endotoxemia but impairs bacterial clearance in murine Escherichia coli peritoneal sepsis. **Shock**, v.8, p.349–356,1997.

ZUCKERMAN, S. H.; EVANS, G. F.; GUTHRIE, L. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. **Immunology**, v. 73, p. 460–5, 1991.

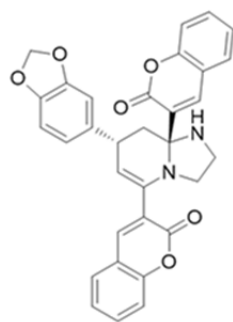
ANEXO 1. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS ONZE DERIVADOS DE IMIDAZOPIRIDINAS SINTETIZADOS



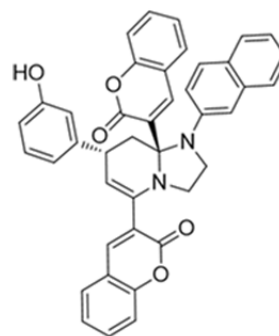
4A



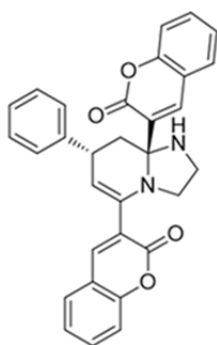
4B



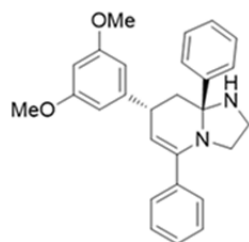
4C



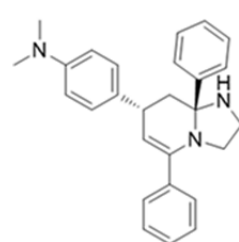
4D



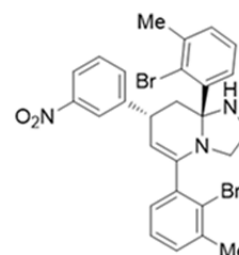
4E



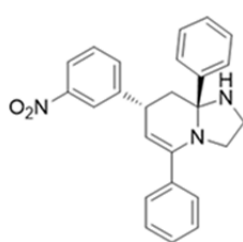
4F



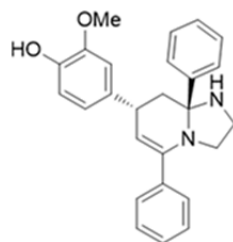
4G



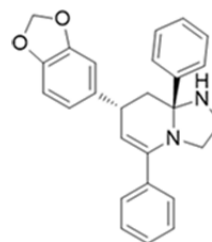
4H



4I



4J



4K