

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JORDANA RODRIGUES DE SANTANA

**Investigação dos mecanismos celulares e moleculares da ação anti-
inflamatória do dipeptídeo cíclico glicina-prolina (CGP)**

Maceió – AL

2020

JORDANA RODRIGUES DE SANTANA

Investigação dos mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória do dipeptídeo cíclico glicina-prolina (CGP)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió – AL

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

S232i Santana, Jordana Rodrigues de.

Investigação dos mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória do dipeptídeo cíclico glicina-prolina (CGP) / Jordana Rodrigues de Santana. – 2020.
102 f. : il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 88-102.

1. Ciclo glicina-prolina. 2. Inflamação. 3. Células endoteliais. I. Título.

CDU: 547.466



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Jordana Rodrigues de Santana

Avaliação dos mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória do dipeptídeo cíclico glicina-prolina (CGP) em células endoteliais

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 6 de Maio de 2020.

Banca Examinadora

Profª Drª Eliane Aparecida Campesatto – (UFAL)

Profª Drª Éurica Adélia Nogueira Ribeiro - (UFAL)

Prof Dr Vinícius de Frias Carvalho – (FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

Iniciei este texto enquanto estava em Nottingham, realizando meu estágio sanduíche. Antes de tudo, gostaria de deixar claro que tudo o que escreverei a partir daqui reflete apenas uma pequena parte do quanto me sinto grata por ter tido a incrível oportunidade de realizar todo este trabalho.

Como em tudo em minha vida, agradeço primeiramente à Deus, que tem feito muitas coisas acontecerem na minha vida desde sempre. É Ele quem sabe do meu mais íntimo e de tudo o que enfrentei em todas as etapas que vivi.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Ana e Zenaldo, que me proporcionaram com muito suor e trabalho a estrutura física e emocional para que eu chegasse neste momento. Também agradeço ao meu companheiro de vida, Smack, por sempre me apoiar e me incentivar em todos os meus projetos profissionais e pessoais.

Agradeço também a minha família LBC, que me acolheu e me ajudou desde que entrei. Obrigada à Juliane, Samário, Polliane, Polyane, Flávio, Lilian, Návylla, Fernanda, Clarice e Marvin por todo apoio na parte experimental e também na parte pessoal, a qual permitiu meu bem-estar durante esses anos.

Sou muito grata por todo apoio que tive durante meu estágio sanduíche. Quero deixar registrado aqui meu agradecimento à professora Maria Augusta Arruda e ao professor Stephen J. Hill pela receptividade e pelos valiosos comentários e sugestões ao meu trabalho. Também quero agradecer aos meus colegas de laboratório Lydia, Desislava, Eddy, Chloe, Nicola, Jack, Charles e Clare, que me ajudaram e também me deixaram fazer parte da família durante esse tempo. Agradeço em especial à Laura Kilpatrick, Mark Soave, Jackie Glenn, Leigh Stoddart, Elizabeth Rosethorne, Marleen Groenen e Tim Self por todo apoio durante a execução dos meus experimentos. Não posso deixar de agradecer também à toda receptividade da Érica Brasil e sua filha Gabriele, que me acolheram e me deram um maravilhoso lar. Érica foi como uma terceira mãe (a segunda é minha amorosa sogra Vânia).

A minha gratidão também se estende a professora Salete Smaniotto, Jamilyle Nunes e Danielma Reis por todos os conselhos e incentivo para a execução deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao professor Emiliano Barreto pela confiança depositada em mim desde o convite para iniciar este trabalho até hoje. Obrigada por todo tempo dedicado a mim, cientificamente e pessoalmente. Sou grata por todo o aprendizado e crescimento ao seu lado.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Universidade Federal de Alagoas e a Universidade de Nottingham pelo apoio institucional, na pessoa dos orientadores e professores. Agradeço também à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O processo inflamatório, embora benéfico, está intimamente envolvido na fisiopatologia de várias doenças. O uso dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado ainda constitui um problema para os pacientes, pois o uso prolongado está associado a efeitos colaterais severos. Logo, identificar novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios inflamatórios é relevante. Os peptídeos cíclicos têm despertado interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos, tanto que mais de 40 medicamentos à base de peptídeos cíclicos foram aprovados pela agência reguladora de fármacos norte-americana FDA para uso clínico na última década. O dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina, CGP) além dos efeitos neuroprotetores, tem sido descrito, pelo nosso grupo de pesquisa, como possuidor de efeitos analgésicos e anti-inflamatórios por inibir a hipernociceção e o acúmulo de leucócitos no tecido inflamado. A partir destes resultados, buscamos identificar alvos celulares e moleculares que poderiam responder pela ação anti-inflamatória do CGP. Inicialmente, constatamos a ausência de citotoxicidade do CGP, em todas as concentrações testadas (10-300 μ M), o que garantiu segurança para interpretar os resultados obtidos. Em seguida, verificamos que a adesão de neutrófilos às células endoteliais tratadas com CGP foi inibida de forma significativa em todas as concentrações testadas (10-50 μ M). Ao avaliar o conteúdo de moléculas de adesão nas células endoteliais verificamos que o CGP não afetou a expressão de ICAM-1 e E-selectina. De forma semelhante, o CGP também não afetou de forma significativa a produção de IL-6, IL-8, IL-12p70 e espécies reativas de oxigênio (ROS) por células endoteliais estimuladas com TNF- α . Ao avaliar a motilidade das células endoteliais verificamos que o CGP não afetou a migração celular. Entretanto, o CGP induziu um aumento significativo no influxo de cálcio em células endoteliais estimuladas com histamina, fenômeno que não foi observado quando as células foram estimuladas apenas com CGP. A este respeito, avaliando a competição do CGP pela ligação em receptores acoplados à proteína G foi avaliada pela técnica de NanoBRET, constatamos que o CGP promoveu um aumento na interação entre os receptores H1 e β 2 e seus respectivos ligantes naturais, fenômeno que não foi observado para outros receptores, como A1, A2A, A2B, A3, VEGFR2, CXCR4 e CXCR7. Tomados em conjunto, demonstramos, pela primeira vez, que o CGP pode interagir com os receptores H1 e β 2 e seus ligantes, de forma que tal interação pode estar associada aos efeitos deste dipeptídeo sobre o endotélio.

Palavras-chave: ciclo-glicina-prolina, inflamação, células endoteliais.

ABSTRACT

Although often beneficial, the inflammatory process is closely involved in the pathophysiology of several diseases. The use of anti-inflammatory drugs available on the market is still a problem for patients, as the prolonged use is associated with severe side effects. Therefore, it is relevant to identify new molecules with therapeutic potential for the treatment of inflammatory disorders. Cyclic peptides have attracted interest from the pharmaceutical industry for drug development that more than 40 cyclic peptide-based drugs have been approved by the FDA for clinical use in the past decade. In addition to neuroprotective effects, the cyclic dipeptide cyclo (Glycine-Proline, CGP), has been described by our research group as having analgesic and anti-inflammatory effects by inhibiting hypernociception and the accumulation of leukocytes in inflamed tissue. From these results, our main objective was to identify cellular and molecular targets that could account for the anti-inflammatory action of CGP. Initially, we found that CGP does not present cytotoxicity in all tested concentrations (10-300 μ M). Our results also showed that CGP significantly inhibited the adhesion of neutrophils to endothelial cells at all concentrations tested (10-50 μ M). We verified that CGP did not affect the expression of ICAM-1 and E-selectin. Similarly, CGP also did not significantly affect the production of IL-6, IL-8, IL-12p70 and reactive oxygen species (ROS) by endothelial cells stimulated with TNF- α . When assessing the motility of the endothelium, our results show that CGP did not affect cell migration. However, CGP induced a significant increase in calcium influx in endothelial cells stimulated with histamine, a phenomenon that was not observed when cells were stimulated with CGP alone. In this regard, evaluating the competition of CGP for binding to receptors coupled to protein G was evaluated by the NanoBRET technique, we found that CGP promoted an increase in the interaction between H1 and β 2 receptors and their respective natural ligands, a phenomenon that was not observed for other receptors, such as A1, A2A, A2B, A3, VEGFR2, CXCR4 and CXCR7. Taken together, we demonstrated, for the first time, that CGP may interact with H1 and β 2 receptors and their ligands in which it may be associated with the effects of this dipeptide on the endothelium.

Keywords: cyclo-Gly-Pro, inflammation, endothelial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sinais cardinais da inflamação	16
Figura 2 – Mecanismos gerais da inflamação	18
Figura 3 – Mecanismos gerais da inflamação (CONTINUAÇÃO)	19
Figura 4 – A célula endotelial e suas principais funções.	21
Figura 5 – Desenho esquemático junções presentes nas células endoteliais	22
Figura 6 – Esquema da adesão e migração de leucócitos no leito vascular.	33
Figura 7 – Mecanismo de ação dos AINEs seletivos e não-seletivos e estrutura química de AINEs não seletivos mais utilizados	36
Figura 8 – Estrutura química dos dois principais inibidores da COX-2	37
Figura 9 – Mecanismo de ação nuclear dos glicocorticoides	39
Figura 10 – Estrutura química da ciclosporina A.	44
Figura 11 – Estrutura química do dipeptídeo cíclico ciclo(Histidina-Prolina).	45
Figura 12 – Estrutura química do dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina).	47
Figura 13 – Característica morfológica das linhagens celulares utilizadas nos experimentos.....	50
Figura 14 – CGP não induz efeitos citotóxicos em células endoteliais	58
Figura 15 – Adesão de neutrófilos às células endoteliais estimuladas e tratadas com CGP.....	59
Figura 16 – Perfil de expressão de ICAM-1 em células endoteliais estimuladas com TNF- α e tratadas com CGP	61
Figura 17 – Perfil de expressão de E-selectina em células endoteliais estimuladas com TNF- α e tratadas com CGP.....	62
Figura 18 – Produção de citocinas pro-inflamatórias em células endoteliais estimuladas	67
Figura 19 – Ação do CGP sobre a geração de espécies reativas de oxigênio.	68
Figura 20 – Ação do CGP sobre os níveis de cálcio intracelular na presença de histamina.....	69
Figura 21 – Migração espontânea das células endoteliais.	71
Figura 22 – Efeito do CGP sobre a migração de células HUVEC estimuladas com VEGF.....	71

Figura 23 – Interação do CGP com receptores H1 em células humanas HEK293T.....	74
Figura 24 – Interação do CGP com receptores β_2 em células humanas HEK293T.....	75
Figura 25 – Interação do CGP com receptores A ₁ , A _{2A} em células humanas HEK293T.....	76
Figura 26 – Interação do CGP com receptores A _{2B} e A ₃ em células humanas HEK293T.....	77
Figura 27 – Interação do CGP com receptores CXCR4 e CXCR7 em células humanas HEK293T.....	78
Figura 28 – Interação do CGP com receptores VEGFR2 em células humanas HEK293T.....	79
Figura 29 – Ação do CGP sobre células endoteliais <i>in vitro</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS

A23187 – Ionóforo de cálcio

AA – Ácido araquidônico

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP-1 (*activator protein-1*)

APC – Aloficocianina (*Allophycocyanin*)

BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro

bFGF - *Basic fibroblast growth factor*

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalase

CBA - *Cytometric Bead Array*

CD - *Cluster of differentiation*

CGP – Ciclo glicina-prolina

COX – Ciclooxigenase

CXCR – *Chemokine receptor*

DAMPs – Padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*)

DBD – Domínio central de ligação ao DNA

DCs – Dipeptídeos cíclicos

DCFH-DA - *5-(-6)-carboxy-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGF - *Epidermal growth factor*

ESAM – *Endothelial cell-selective adhesion molecule*

ESL-1 - *E-selectin ligand-1*

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GPX – Glutathione peroxidase

GR – Receptor de glicocorticoide

GRE – Elementos de resposta glicocorticoide

HPLC - *High performance liquid chromatography*

HUVEC – *Human umbilical vascular endothelial cell*

IA – Índice de adesão

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular – 1 (*Intercellular cell adhesion molecule-1*)

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*)

IL – Interleucina

IκB – quinase inibidora do fator nuclear κB

JAK - *Janus kinase*

JAM – *Junctional adhesion molecule*

LDB – Domínio de ligação ao ligante

LFA-1 – *Lymphocyte function-associated antigen*

LPS - Lipopolissacarídeo

MAC-1 - *Macrophage-1 antigen*

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*

MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1*

MEC – Matriz extracelular

MPO - Mieloperoxidase

MTT - *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NanoBRET - *Bioluminescence resonance energy transfer* (BRET) utilizando NanoLuc® Luciferase

NF-κB - (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLR – *Nod-like receptors*

NTD – Domínio de transativação N-terminal

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PECAM -1 - *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

PIGF - *Placental Growth Factor*

PLA – Fosfolipase - A

PRR – Padrões de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors*)

PSGL-1 - *P-selectin glycoprotein ligand-1*

RANTES - *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted*

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)

RNA - Ácido ribonucleico

RNS – Espécies reativas de nitrogênio (*Reactive nitrogen species*)

RPM – Rotações por minuto

SBF – Soro bovino fetal

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

STAT - *Signal transducers and activators of transcription*

TGF- α – Fator de crescimento transformante alfa (*Transforming growth factor alpha*)

TGFB β p - *Transforming growth factor β -induced Protein*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

t-PA - *Tissue-type Plasminogen Activator*

TLR – Receptores toll-like (*toll-like receptors*)

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

VCAM-1 – Molécula de adesão vascular – 1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*)

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR-2 - *Vascular endothelial growth factor receptor - 2*

VLA-4 - Integrina $\alpha 4\beta 1$ (*very late antigen-4*)

VPF - *Vascular permeability factor*

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

ZO - *Zonula occludens-1*

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	13
2 - OBJETIVOS	15
2.1 - Geral	15
2.2 - Específicos	15
3 - REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 - Aspectos gerais da inflamação	16
3.2 - A célula endotelial e sua participação no processo inflamatório	20
3.2.1 – Célula endotelial: características e funções	20
3.2.2 – O papel do endotélio no processo inflamatório	26
3.2.2.1 – Níveis de Cálcio	26
3.2.2.2 – Permeabilidade celular	27
3.2.2.3- Citocinas e quimiocinas inflamatórias	27
3.2.2.4 - Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	29
3.2.2.5 - Moléculas de adesão celular.....	30
3.2.2.6 - Transmigração de leucócitos.....	32
3.3 - Terapia da inflamação	34
3.3.1 - Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	34
3.3.1.1– AINEs não seletivos, seletivos e seus efeitos adversos.....	36
3.3.2 - Glicocorticoides.....	38
3.3.3 - Novos alvos terapêuticos	40
3.4 - Produtos de origem natural como agentes anti-inflamatórios	41
3.5 - Peptídeos e dipeptídeos cíclicos	44
3.5.1 - Dipeptídeo cíclico glicina-prolina.....	47
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 - Cultivo celular e CGP	49
4.2 - Viabilidade celular	50
4.3 - Ensaio de adesão de neutrófilos ao endotélio	51
4.4 - Expressão de ICAM-1 na membrana das células endoteliais	52
4.5. - Ensaio de imunofluorescência para E-selectina	52
4.6 - Quantificação de citocinas inflamatórias	53

4.7 - Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	53
4.8 – Mobilização de Cálcio	54
4.9 – Avaliação da migração de células endoteliais	54
4.9.1 - <i>Ensaio de migração por live imaging</i>	55
4.10 – Ensaio de transferência de energia de ressonância bioluminescente (NanoBRET)	56
4.8 – Análise estatística	57
5 - RESULTADOS	58
5.1 Efeito do CGP sobre a viabilidade de células endoteliais	58
5.2 - Efeito do CGP na adesão endotélio-neutrófilo	58
5.3 - Efeito do CGP na expressão de ICAM-1 em células endoteliais	60
5.4 - Efeito do CGP sobre a expressão de E-selectina.....	61
5.5 - Efeito do CGP na produção de citocinas pró-inflamatórias	67
5.6 - Efeito do CGP na geração de espécies reativas de oxigênio	68
5.7 - Mobilização de Cálcio	69
5.8 - Efeito do CGP sobre a migração de células endoteliais	70
5.9 - Interação do CGP com sítios de ligação em receptores envolvidos com a resposta inflamatória	73
6 - DISCUSSÃO	80
7 - CONCLUSÃO	87
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 - INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta adaptativa essencial à vida caracterizada pela ação do sistema imune contra estímulos nocivos de origem biológica, química ou física, com propósito de remover estes estímulos e restaurar a homeostasia do tecido (CHEN *et al.*, 2018). No entanto, a inflamação descontrolada ou não adequadamente resolvida pode levar a dano tecidual, o qual está diretamente interligado com doenças crônicas, incluindo as metabólicas e autoimunes. De fato, sinais persistentes do processo inflamatório não resolvido também estão associados à uma diversidade de doenças como as cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e diabetes, que estão entre as principais causas de mortalidade no mundo (SUGIMOTO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Apesar do arsenal terapêutico disponível para o tratamento da inflamação ser amplo, o uso prolongado dos fármacos anti-inflamatórios resulta em diversos, e as vezes severos, efeitos adversos. Como exemplo, cabe destacar os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), conhecidos por causarem problemas gastrointestinais que variam de dor gástrica, hemorragia gástrica e úlcera duodenal (STEINMEYER, 2000; COOPER *et al.*, 2019). Além destes, os glicocorticoides ou corticoides são também exemplos de fármacos extensamente utilizados devido suas propriedades anti-inflamatórias, porém, de forma semelhante aos AINEs, causam efeitos adversos, incluindo danos cardiovasculares, gastrointestinais, no músculo esquelético e no sistema nervoso central (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

A elevada incidência dos efeitos adversos ocasionados pelos anti-inflamatórios atualmente disponíveis estimula a busca de novas moléculas com atividade anti-inflamatória. Neste cenário, moléculas obtidas de fontes naturais, ou inspiradas em compostos obtidos da natureza, mostram-se valiosas devido ao potencial de efeitos farmacológicos ainda a serem descritos/caracterizados. Os peptídeos cíclicos pertencem a uma classe de peptídeos que tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Essa classe de peptídeos tem sido aplicada em diferentes áreas do conhecimento, como a indústria farmacêutica (devido à sua atividade antibacteriana, antitumoral ou antioxidante), aplicações agrícolas (como fungicidas), diagnósticos e vacinas (GOWRISHANKAR *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2014). Na última década, mais

de 40 medicamentos à base de peptídeos cíclicos foram aprovados pela agência reguladora de fármacos norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; ZORZI, DEYLE; HEINIS, 2017). Muito desse interesse da indústria farmacêutica pelos peptídeos cíclicos deve-se a versatilidade molecular destas estruturas, baixa toxicidade e afinidade de ligação a outras moléculas (JING; JIN, 2020). Para se ter uma ideia do potencial farmacológico dos peptídeos, vale a pena mencionar a ciclosporina A, um peptídeo cíclico natural, utilizado desde o início dos anos 80 como agente imunossupressor (MATSUDA; KOYASU, 2000). Há também a murepavadina que é um peptídeo cíclico sintético derivado do peptídeo natural protegina-1, que devido suas propriedades antimicrobianas, está atualmente em ensaios clínicos de Fase III para tratamento de pneumonia nosocomial (MARTIN-LOECHES; DALE; TORRES, 2018). Estudos prévios revelaram que o dipeptídeo cíclico ciclo(Histidina-Prolina) mostra-se capaz de apresentar efeito neuroprotetor e anti-inflamatório por suprimir a sinalização intracelular mediada por NF- κ B (FADEN *et al.*, 2003; BELLEZZA *et al.*, 2014). A diversidade de efeitos farmacológicos dos dipeptídeos cíclicos se estendem ainda a ações antitumorais, como no caso do dipeptídeo cíclico ciclo(Triptofano-Prolina) (ABRAHAM, 2018), e pelos efeitos de melhorias da função de memória como os induzidos pelo dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina) (GUAN *et al.*, 2007).

O dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina), formado pela ciclização entre a glicina e prolina, chamado neste estudo de CGP, além do efeitos neuroprotetores (SAMONINA; ASHMARIN; LYAPINA, 2002), tem sido reportado na literatura científica como detentor de outros efeitos terapêuticos relevantes, tais como ações analgésicas e anti-inflamatórias (LEE, 2011; SAMONINA; ASHMARIN; LYAPINA, 2002). Contribuindo para a compreensão dos efeitos terapêuticos do CGP, nosso grupo de pesquisa em atuação na UFAL reportou que este dipeptídeo foi capaz de inibir a função da glândula salivar (MELO *et al.*, 2020), a hipernocicepção por um mecanismo dependente de receptores opioides e a inflamação local por impedir o acúmulo de leucócitos para o tecido estimulado (FERRO *et al.*, 2015). Apesar destes importantes efeitos do CGP sobre a inflamação, até o momento, ainda não havia sido descrito os potenciais alvos celulares e moleculares para as ações anti-inflamatórias do CGP. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo investigar os possíveis alvos moleculares para ligação deste dipeptídeo cíclico em células endoteliais.

2 - OBJETIVOS

2.1- Geral:

Avaliar em células endoteliais os possíveis alvos moleculares para interação do dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina) (CGP) responsáveis pelas suas ações anti-inflamatórias.

2.2 - Específicos:

Investigar *in vitro* os efeitos do CGP sobre:

- A adesão de neutrófilos ao endotélio vascular.
- A viabilidade e a migração de células endoteliais.
- A produção de citocinas inflamatórias pelo endotélio.
- A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).
- Expressão de moléculas endoteliais envolvidas na adesão celular.
- Os níveis de cálcio intracelular em células endoteliais.
- Competição por receptores envolvidos na resposta inflamatória.

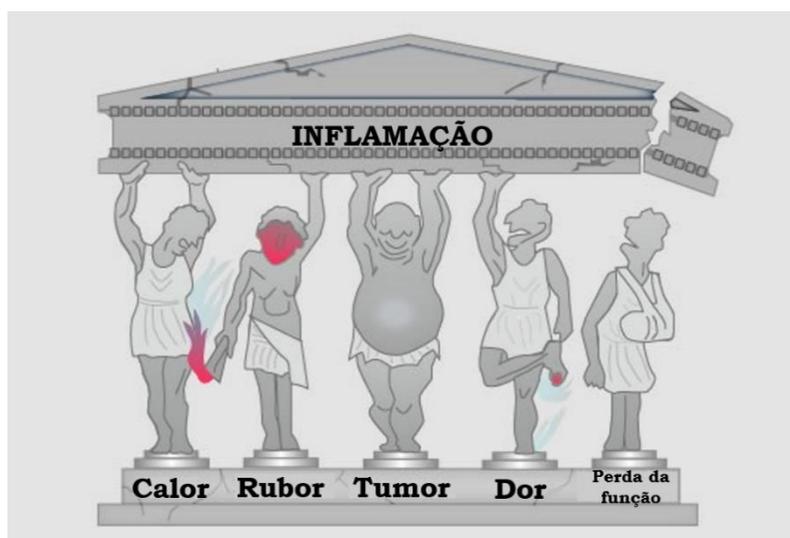
3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é uma resposta adaptativa de tecidos vascularizados contra estímulos nocivos, cuja função primária é destruir rapidamente ou isolar a fonte da lesão, remover o tecido danificado e restaurar a homeostase (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). A resposta inflamatória é altamente heterogênea em relação aos tipos celulares e mediadores moleculares envolvidos, podendo ser classificada de acordo com o tempo em aguda ou crônica; com a localização em local ou sistêmica e pela intensidade em baixa ou elevada (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; OKIN; MEDZHITOV, 2012).

As manifestações clínicas da inflamação resultantes de fenômenos vasculares e exsudativos são conhecidas desde a antiga Roma, suas características macroscópicas foram descritas por Cornelius Celsius como sinais cardinais da inflamação denominados em rubor, tumor, calor e dor (FIGURA 1). O quinto sinal cardinal, denominado perda de função, foi adicionado apenas em 1858 por Rudolph Virchow (FIGURA 1). Apesar de os quatro sinais cardinais se aplicarem apenas à inflamação aguda, a perda de função é o único sinal que acompanha todos os processos inflamatórios.

FIGURA 1 – Sinais cardinais da inflamação.



Fonte: Adaptado de *The 5 Cardinal Signs of Inflammation*. Disponível em: <<http://www.jst.go.jp/crest/inflam/illust/images/illust.jpg>>. Acesso em: 05 de junho de 2019.

A base fisiológica da inflamação foi revelada por Augustos Waller (1846) e Julius Cohnheim (1867) que descreveram a migração de leucócitos pelos vasos e outras mudanças vasculares características da resposta inflamatória. Cohnheim observou sob o microscópio a vasodilatação, extravasamento de plasma e a migração de leucócitos para os tecidos (MEDZHITOV, 2010). Em 1892, Elie Metchnikoff caracterizou a fagocitose e enfatizou os efeitos benéficos da inflamação bem como o papel de macrófagos e neutrófilos tanto na defesa do hospedeiro quanto para a manutenção da homeostase (TAUBER, 2003). Avanços subsequentes incluem a identificação de diferentes classes de mediadores inflamatórios, as vias que controlam sua produção e mecanismos de ação.

Uma resposta inflamatória típica é caracterizada pela presença de indutores inflamatórios, sensores que os reconhecem (receptores que reconhecem padrões danosos) assim como pela ativação das vias inflamatórias, liberação de mediadores inflamatórios e o recrutamento celular para o tecido alvo (FIGURA 2). Dependendo da natureza dos indutores, as células possuidoras de sensores produzem combinações e quantidades diferentes dos mediadores, criando uma resposta única para o indutor. (MEDZHITOV, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012; CHEN *et al.*, 2018).

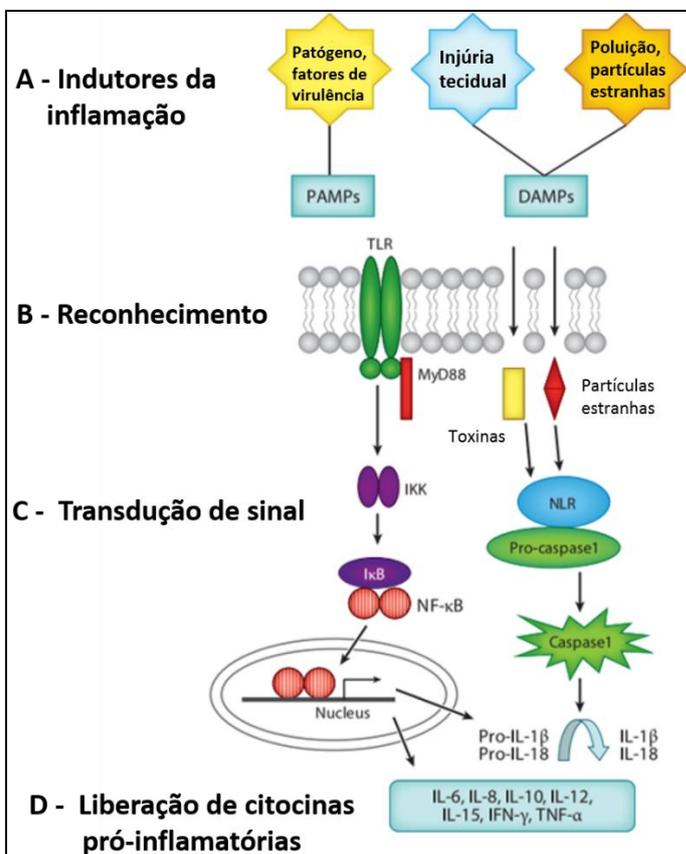
O primeiro passo desta resposta envolve o reconhecimento da infecção ou dano através de receptores de reconhecimento de padrões, do inglês *pattern-recognition receptors* (PRR) expressos em células do sistema imunológico. Alguns PRRs reconhecem sinais endógenos característicos de dano tecidual e celular e são conhecidos como DAMPS (*damage-associated molecular patterns*) (CHEN *et al.*, 2018). Já outros reconhecem estruturas microbianas e são denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (FIGURA 2) (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

Em casos de infecção, esse reconhecimento inicial é mediado por macrófagos e mastócitos residentes no tecido. Logo em seguida ao reconhecimento dos ligantes, os receptores TLRs (*toll-like receptors*) ativam vias de sinalização comuns que, por sua vez, culminam na ativação do NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (FIGURA 2) (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Este fator de transcrição é encontrado em todos os tipos celulares e permanece em seu estado inativo quando ligado ao seu inibidor, o I κ B (GHOSH, MAY, KOPP, 1998). Quando a transdução de sinal é iniciada, o NF- κ B é liberado do seu inibidor translocando-se para

o núcleo onde induz a transcrição de genes pro-inflamatórios. O estímulo destes receptores também ativa outras vias intracelulares, como a via das MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), resultando na ativação de vários fatores de transcrição como o AP-1 (*activator protein-1*), o qual promove a transcrição de mediadores pró-inflamatórios (FIGURA 2). As MAPK regulam diversas respostas celulares como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular além do processo apoptótico. Por outro lado, em caso de lesão celular, os receptores NLRs (*nod-like receptors*) intracelulares respondem à uma variedade de DAMPs que alertam ao sistema imune a presença de dano celular (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; MOENS; KOSTENKO; SVEINJORNSSON, 2013).

A transcrição e tradução de genes levam à terceira fase da cascata inflamatória, identificada como a expressão induzida de citocinas pró-inflamatórias, como (IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) e liberação de mediadores importantes, como as aminas vasoativas (histamina e serotonina), eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos) e quimiocinas (CCL2, CXCL8) (MEDZHITOV, 2010; ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

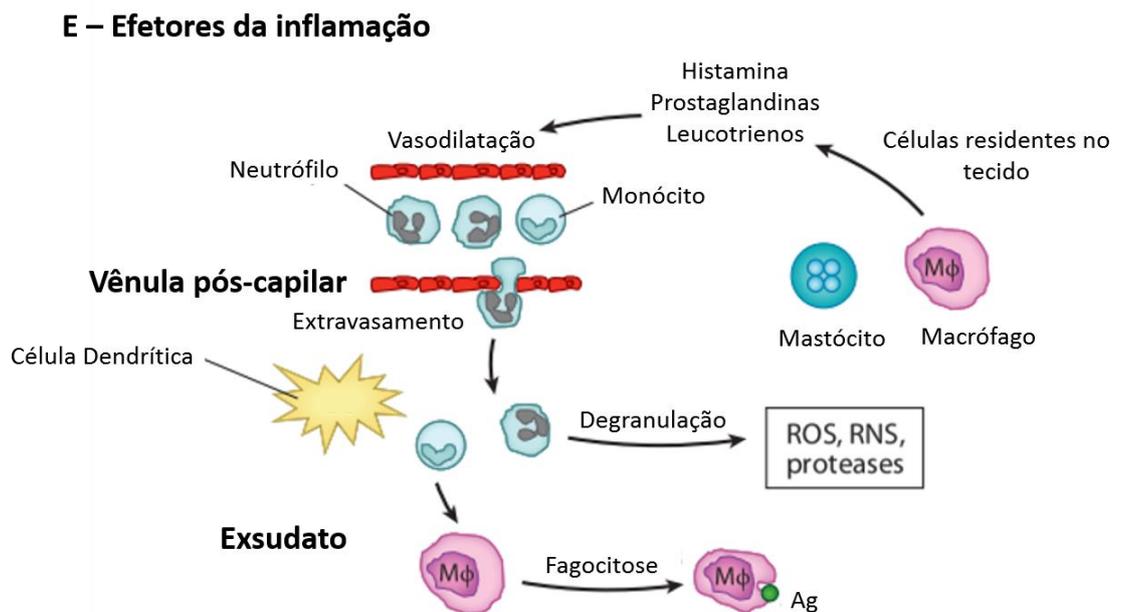
FIGURA 2 – Mecanismos gerais da inflamação.



A) Estímulos induzem a inflamação. B) Moléculas capazes de reconhecer os estímulos. C) Vias de sinalização intracelular dependente de MyD88 que envolve a fosforilação pelo IKK da proteína inibidora I κ B. Em seguida o NF- κ B é liberado e transloca para o núcleo e promove a transcrição de genes inflamatórios. Os NLRs ativam o inflamosoma, que ativa a caspase-1 e converte IL-1 β e IL-18 para suas formas ativas. D) Resposta celular para promover as funções efetoras da inflamação. Adaptado de: ASHLEY; WEIL, NELSON, 2012. *Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 43:385–406.

A liberação destes mediadores induz a vasodilatação, o recrutamento de células efetoras como monócitos e neutrófilos e extravasamento de plasma para o tecido. Os neutrófilos recrutados criam um ambiente citotóxico através da liberação de moléculas armazenadas em seus grânulos. Este processo é denominado desgranulação e envolve a produção/liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) além de proteínases. Estes mediadores causam danos ao patógeno e ao hospedeiro, sendo este um importante mecanismo responsável pela consequência deletéria da inflamação no hospedeiro (FIGURA 3). Em todo este processo também há a participação de componentes do plasma como anticorpos e o sistema complemento. (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV, 2010; ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; CHEN *et al.*, 2018).

FIGURA 3 – Mecanismos gerais da inflamação.



E) Neutrófilos e monócitos provenientes do sangue migram para o sítio inflamatório por quimiotaxia e passam seletivamente pelas células endoteliais para chegar aos tecidos (extravasamento). Este influxo de células é acompanhado pelo exsudato, um fluido rico em proteínas responsável pelo edema. Mastócitos e macrófagos residentes no tecido estimulam essa migração através da liberação de histaminas, leucotrienos e prostaglandinas. Estes mediadores têm um efeito rápido sobre a vasculatura, incluindo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade do vaso sanguíneo. Os neutrófilos liberam componentes tóxicos, incluindo ROS, RNS e várias proteases, os quais são inespecíficos e causam danos tanto ao patógeno quanto ao hospedeiro. Os macrófagos e células dendríticas participam na fagocitose dos antígenos (Ag). Adaptado de: ASHLEY; WEIL, NELSON, 2012. *Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 43:385–406.

A inflamação aguda normalmente é dissipada quando o agente causador é eliminado, a infecção abolida e o tecido reparado. O término da resposta inflamatória e transição para o estado de homeostase é um processo ativo e altamente regulado conhecido como a resolução da inflamação. Foi recentemente demonstrado que a resolução não é o final da resposta do organismo ao estímulo, mas atua como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, e que desta forma, existe uma terceira fase após a inflamação aguda e resolução, denominada pós-resolução (MEDZHITOV, 2010; FULLERTON; GILROY, 2016). Os eventos celulares e moleculares desta fase envolvem a diminuição ou supressão do extravasamento celular, a redução das quimiocinas e citocinas, a inativação de vias de sinalização associadas com a sobrevivência de leucócitos e a indução de apoptose dos mesmos e sua subsequente remoção pelos macrófagos, a alteração do perfil clássico dos macrófagos ativados, o retorno de células para a vasculatura ou linfonodo e o início do processo de restauração (LAWRENCE; GILROY, 2007; SUGIMOTO *et al.*, 2016).

De forma similar ao início da resposta inflamatória, a resolução da inflamação é coordenada e regulada por um amplo painel de mediadores. Os mediadores pró-resolutivos atendem a alguns critérios que intimamente relacionados aos sinais da resolução. São exemplos destes mediadores: lipoxinas (ex: LXA₄), resolvinas (ex: RvD1), protectinas, maresinas, proteínas e peptídeos (ex.: annexina A1), galectina 1, adenosina, acetilcolina e outros neuropeptídeos. A resolução inadequada ou insuficiente pode levar à inflamação crônica, dano tecidual excessivo, desregulação do remodelamento tecidual e fibrose. Portanto, o processo inflamatório contínuo e uma resolução insatisfatória podem levar ao desenvolvimento de diversas doenças, como diabetes e aterosclerose (MEDZHITOV, 2010; SUGIMOTO *et al.*, 2016).

3.2 - A célula endotelial e sua participação no processo inflamatório

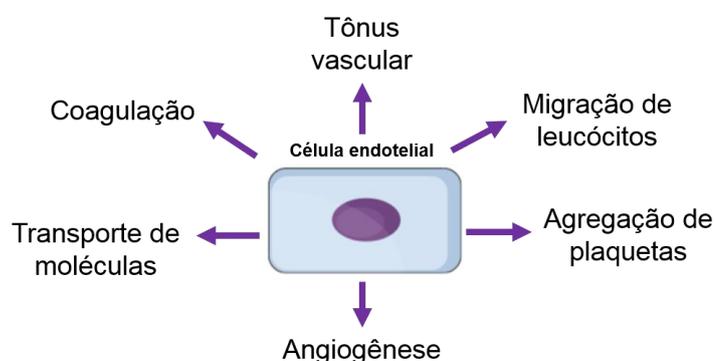
3.2.1 – Célula endotelial: características e funções

O endotélio é uma monocamada de células que delimita o lúmen dos vasos sanguíneos de todo o sistema circulatório, desde o coração até os menores capilares. Após serem consideradas inertes por muitos anos, estudos demonstram que as células endoteliais têm um importante papel na homeostase da fisiologia corporal, no

controle da permeabilidade e do tônus vascular (PATE *et al.*, 2010; CRAIGE; KANT; KEANEY *et al.*, 2015).

Conhecidas por serem dinâmicas e com um fenótipo adaptável de acordo com sua localização, as células endoteliais possuem variadas funções incluindo a formação de uma barreira celular, a transferência de oxigênio e nutrientes, a formação de novos vasos e a secreção de uma diversidade de mediadores que estão associados sua capacidade de regulação vasomotora, controle da adesão de leucócitos e agregação de plaquetas (BIERHANSL *et al.*, 2017). (FIGURA 4)

FIGURA 4 – A célula endotelial e suas principais funções.



Fonte: Autor, 2019.

As células endoteliais formam uma barreira contínua, semipermeável e restritiva. Esta barreira permite a passagem de macromoléculas, células inflamatórias e fluidos entre o sangue e o espaço intersticial. Existem duas rotas de transporte pela barreira endotelial: a transcelular (por dentro das células) e a paracelular (entre as células). A rota transcelular é adotada por moléculas maiores. Um exemplo de transporte transcelular é a albumina. As moléculas solúveis menores como ureia, glicose, aminoácidos e alguns íons bem como células inflamatórias são transportadas através do endotélio por meio da rota paracelular. A permeabilidade paracelular também permite o extravasamento de fluido rico em proteínas, o que resulta na formação do edema no processo inflamatório (MITTAL *et al.*, 2014).

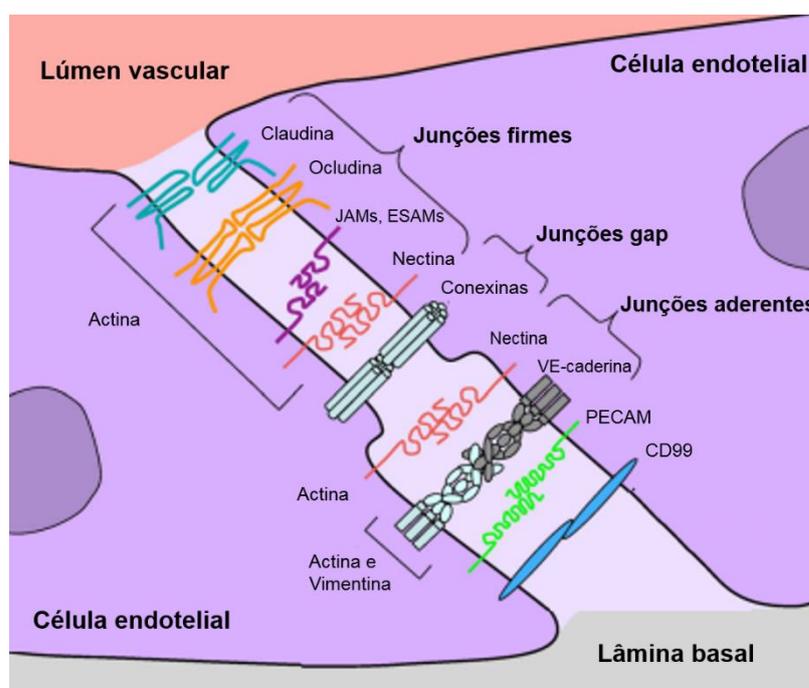
O endotélio é uma monocamada contínua formada por células aderidas umas às outras por diferentes estruturas adesivas ou junções aderentes. Estas estruturas complexas são formadas por moléculas adesivas transmembrana ligadas a uma rede de proteínas citoplasmáticas e do citoesqueleto. Foram descritos três tipos de junções

nas células endoteliais junções firmes, junções aderentes e junções *gap* (MICHIELS, 2003).

Nas junções firmes, a adesão é mediada por membros da família da claudina (claudina 5), da ocludina, moléculas de adesão juncionais (JAMs - *junctional adhesion molecules*), da molécula de adesão seletiva de células endoteliais (*ESAM - endothelial cell selective adhesion molecule*) e de alguns componentes intracelulares, como a zona-occludens-1 (ZO-1) que são responsáveis pela interação de alguma destas proteínas com o citoesqueleto (WALLEZ; HUBBER, 2008).

Nas junções aderentes, a proteína adesiva mais proeminente é a VE-caderina (*vascular endothelial cadherin*) que participa no controle da permeabilidade celular bem como na transmigração de leucócitos (WALLEZ; HUBBER, 2008). A nectina participa de ambas as junções e a PECAM (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) não participa das junções, mas contribui para a adesão célula-célula (DEJANA, 2004) (FIGURA 5). A CD99 facilita a transmigração dos leucócitos. Já as junções *gap* agregam canais intercelulares como as conexinas, que permitem a transferência entre células de íons e moléculas pequenas (WALLEZ; HUBBER, 2008; GOODENOUGH; PAUL, 2009).

Figura 5 – Desenho esquemático das junções presentes nas células endoteliais.



Fonte: Adaptado de WALLEZ, Y.; HUBER, P., 2008. *Endothelial adherens an tight junction in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 794–809.

A organização das junções entre as células endoteliais varia em composição e componentes morfológicos na árvore vascular, dependendo dos requisitos de permeabilidade. As junções aderentes são ubíquas em todos os tipos vasculares. Entretanto, as junções firmes são pouco organizadas onde acontecem mudanças rápidas na permeabilidade, como nas vênulas pós-capilares, no entanto são extremamente complexas onde a permeabilidade é estritamente controlada como na microvasculatura cerebral. (DEJANA, 2004).

Em condições fisiológicas, as células endoteliais inibem a formação de trombo através de mecanismos anticoagulantes e anti-plaquetas. Estas células estão envolvidas em mecanismos homeostáticos iniciados após a lesão vascular e limitam a formação do coágulo em áreas nas quais a necessário restaurar a integridade vascular. Alterações neste balanço podem resultar em sangramento e trombose. O endotélio também tem um papel central na coagulação através da expressão de sítios de ligação anticoagulantes ou coagulantes na superfície celular (RAJENDRAN *et al.*, 2013). A interação entre plaquetas e o endotélio tem um papel integral na ativação e regulação das plaquetas. Enquanto que o endotélio intacto inibe a adesão de plaquetas por meio da liberação de óxido nítrico e prostaglandina I₂, as células endoteliais ativadas expressam uma variedade de moléculas e receptores que aumentam a adesão plaquetária no local da lesão. Estruturas intracelulares denominadas corpos de Weibel-Palade armazenam moléculas incluindo o fator de Von-Willebrand, P-selectina, angiopoietina-2, t-PA (*tissue-type plasminogen activator*) e endotelina-1, os quais participam da adesão plaquetária, recrutamento de leucócitos, modulação da inflamação, fibrinólise e vasoconstrição (YAU; TEOH; VERMA, 2015).

A migração do endotélio possui papel central numa variedade de processos fisiológicos e patológicos. As células endoteliais migram durante a formação de vasos bem como para restaurar a integridade vascular em situação de dano (MICHAELIS, 2014). Neste processo estão envolvidos três principais mecanismos: a) a quimiotaxia, relacionada com a migração direcional à um gradiente de quimioatraentes solúveis; b) a haptotaxia, que consiste na migração direcional à um gradiente de ligantes imóveis; c) a mecanotaxia, na qual as células migram em decorrência de forças mecânicas. A migração endotelial durante a angiogênese é resultante destes três mecanismos. A quimiotaxia é comumente controlada por fatores de crescimento como o VEGF

(*vascular endothelial growth factor*) e o bFGF (*basic fibroblast growth factor*). Já a haptotaxia é associada com o aumento da migração endotelial em resposta à integrinas que se ligam a componentes da matriz extracelular (LAMALICE; LE BOEUF; HUOT, 2007).

As células endoteliais também produzem moléculas da matriz extracelular (MEC) como a fibronectina, laminina e colágeno. Estas proteínas fornecem suporte importante para o endotélio vascular primariamente através de interações adesivas com integrinas presentes na superfície da célula endotelial, proporcionando um apoio essencial para a manutenção da organização vascular destas células nos vasos sanguíneos. Além disto, a adesão da célula endotelial à MEC é fundamental para a proliferação, migração, sobrevivência e estabilização destas células no vaso. Os mecanismos específicos pelos quais a MEC promove estas funções envolve tanto o suporte externo quanto múltiplas vias de sinalização intracelular implicadas no controle da apoptose, proliferação e morfologia celular (DAVIS; SENGER, 2005).

A formação de novos vasos a partir da vasculatura pré-existente pelo endotélio é denominada de angiogênese. Este processo composto por várias etapas é necessário para a cicatrização, crescimento e possui ações em órgãos do sistema reprodutor feminino. Entre as moléculas endógenas angiogênicas, destaca-se o VEGF, o qual é o maior regulador da formação de vaso em condições normais e anormais. Inicialmente, o VEGF foi denominado como VPF (*vascular permeability factor*) devido sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular (PEACH *et al.*, 2018).

A família VEGF compreende o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF (*placental growth factor*), o VEGF-E codificado por vírus e o derivado de veneno de cobra, o VEGF-F. O VEGF-A é o mais caracterizado e é o mais potente estimulador dos processos angiogênicos. Concomitantemente, também atua alterando a permeabilidade celular e estimula a migração celular (SHIBUYA, 2011; PEACH *et al.*, 2018). Em decorrência de *splicing* alternativo, o VEGF-A possui múltiplas isoformas, incluindo o VEGF₁₁₁ VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆. O VEGF₁₆₅ é a isoforma mais frequente nos tecidos bem como é a mais fisiologicamente relevante (PEACH *et al.*, 2018; APTE; CHEN, FERRARA, 2019). A primeira isoforma caracterizada foi a VEGF_{165a} e continua sendo a mais investigada em relação a sua função, sinalização, expressão e papel na doença. Em decorrência de ser uma

potente estimuladora da angiogênese, esta é considerada a isoforma pró-angiogênica protótipo (PEACH *et al.*, 2018). Os VEGFs se ligam com alta afinidade aos receptores tirosina quinase VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. A sinalização mais proeminente nas células endoteliais vasculares é a resultante da ativação do VEGFR2. Os VEGFs também se ligam com alta afinidade aos membros NRP1 e NRP2 pertencentes à família neuropilina. Além disso também se ligam a proteoglicanos sulfatados de heparan (HSPGs). Estes receptores são co-receptores para os VEGF. A habilidade dos VEGFs de se ligarem simultaneamente a vários tipos de proteínas transmembranares inicia a formação de complexos multiproteicos que incluem, em adição aos receptores e co-receptores, algumas proteínas auxiliares, como integrinas e a efrina B2 (SIMONS; GORDON; CLAEISSON-WELSH, 2016).

O processo de angiogênese consiste de três estágios: a) células endoteliais saem do estado quiescente para o fenótipo angiogênico em resposta à ação do VEGF-A; b) acontece a degradação da MEC capilar resultando no aumento da permeabilidade vascular e o conseqüente extravasamento de proteínas do sangue e seu acúmulo na matriz intersticial de colágeno para formar uma MEC nova e provisória. Em seguida mediante a interação do VEGF-A com seu receptor VEGFR2, as células endoteliais começam a proliferar, invadir a matriz e atuam na formação de uma estrutura capilar imatura e na deposição de uma matriz nova e complexa; c) maturação dos novos vasos formados e inibição da proliferação e migração endotelial. Entre os fatores angiogênicos estão o VEGF, EGF (*epidermal growth factor*) e TGF- α (*transforming growth factor- α*) (TAHERGORABI, KHAZAEI, 2012; NEVE *et al.*, 2014).

A integridade endotelial depende de um balanço entre extensão da lesão celular e a capacidade do reparo endógeno. A disfunção endotelial é caracterizada pela mudança das ações do endotélio em direção à redução da vasodilatação, a um estado pró-inflamatório e pró-trombótico. A perda da integridade endotelial é associada com diversas doenças, incluindo a hipertensão, diabetes, falência renal e infecções virais (RAJENDRAN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2016) Desta forma, as células endoteliais são importantes alvos celulares na inflamação e nos processos de reparo e retorno à homeostasia.

3.2.2 – O papel do endotélio no processo inflamatório

O envolvimento das células endoteliais no processo inflamatório é determinante para as distintas fases da inflamação, incluindo a instalação, propagação e resolução. A ativação destas células acontece em duas etapas, uma mais rápida que independe da expressão gênica, e em outra mais lenta, que depende desta expressão de genes específicos. A etapa inicial é tipicamente mediada por ligantes de receptores associados a proteínas G. O aumento de Ca^{2+} citosólico culmina no aumento da vasodilatação e diminuição da permeabilidade vascular, caracterizada pelo extravasamento de plasma. As altas concentrações de cálcio também promovem a interação entre leucócitos e as células endoteliais. Na segunda etapa de ativação endotelial, mediadores como TNF- α , se ligam ao seu receptor e ativam a transcrição gênica através do NF- κ B e da AP-1. (POBER; SESSA, 2007). Esses fatores atuam na transcrição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8, mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos), espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento e moléculas de adesão (ex.: ICAM-1, E-Selectina, VCAM-1), as quais são indispensáveis para a adesão e transmigração de leucócitos para o sítio inflamatório (POBER; SESSA, 2007; ZHANG, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; PATE *et al.*, 2010). Em seguida serão detalhados mediadores importantes da ativação endotelial.

3.2.2.1 – Níveis de Cálcio

O cálcio tem a capacidade de regular uma variedade de eventos intracelulares em diversas células, incluindo as endoteliais. Várias funções do endotélio dependem das mudanças dos níveis deste mensageiro e na sua resultante sinalização celular. Em células quiescentes, a concentração citoplasmática de cálcio é baixa e mantida por canais transmembrana. No entanto, a sinalização de cálcio pode ser estimulada em células endoteliais por mediadores inflamatórios, como a trombina, a bradicinina e a histamina. A ligação destes mediadores a seus receptores, que incluem receptores associados à proteína G e tirosina quinases, culmina no aumento dos níveis deste mensageiro e na ativação de proteínas dependentes de cálcio. O aumento das concentrações deste íon também está envolvido no aumento da permeabilidade endotelial, através da desorganização das junções aderentes e o rearranjo do

citoesqueleto, o que facilita a retração celular (TIRUPPATHI *et al.*, 2003; FILIPPINI, D'AMORE, D'ALESSIO, 2019; DALAL, MULLER, SULLIVAN, 2020).

3.2.2.2 – Permeabilidade celular

Os estímulos pró-inflamatórios aumentam a permeabilidade endotelial através de uma combinação de mudanças às junções aderentes, às firmes e ao citoesqueleto de actina associado. A composição e integridade das junções aderentes são regulados por mudanças na fosforilação de proteínas juncionais. Uma variedade de mediadores envolvidos na inflamação como LPS, histamina, trombina, VEGF, TNF- α ativam diferentes vias de sinalização que resultam tanto na separação do complexo VE-caderina, sua fosforilação e internalização e desta forma aumentando a permeabilidade celular. O aumento da permeabilidade também está intrinsecamente relacionado com a perda de proteínas nas junções firmes. O TNF- α é um exemplo de um mediador inflamatório associado com a diminuição de claudina-5 nas junções. A expressão de ICAM-1 nas células endoteliais ativadas resulta na formação de fibras de estresse bem como no aumento da produção de óxido nítrico, fatores que também vão contribuir para o aumento da permeabilidade (SUKRITI *et al.*, 2014; CERUTTI; RIDLEY, 2017).

3.2.2.3- Citocinas e quimiocinas inflamatórias

As citocinas são importantes moduladores inflamatórios e participam na inflamação aguda e crônica. Elas podem ser classificadas baseadas na natureza da resposta imune, com citocinas exercendo papéis específicos dependendo do tipo celular e localização. De acordo com sua liberação, podem ser classificadas em: a) linfocinas, citocinas liberadas pelas células T e regulam a resposta imune; b) citocinas pró-inflamatórias, que amplificam o processo inflamatório; c) fatores de crescimento intimamente envolvidos na sobrevivência celular; d) quimiocinas, que são moléculas atraentes para as células inflamatórias e e) citocinas anti-inflamatórias, as quais atuam na modulação negativa da inflamação (GULATI *et al.*, 2016).

Pertencente a grande família IL-6 de citocinas, a interleucina 6 (IL-6) é um mediador solúvel com efeito pleitrópico na inflamação, resposta imune e na

hematopoiese. É expressa por diferentes células, incluindo fagócitos mononucleares, fibroblastos, células T e B e células endoteliais. A secreção desta citocina é aumentada em resposta à inflamação, estresse oxidativo e lesão vascular. Mediante a ativação das células endoteliais por mediadores como TNF- α , o aumento da liberação de citocinas resultante incluindo a IL-6, afeta não só o microambiente induzindo a inflamação local, mas também induz uma resposta inflamatória sistêmica. Quando ligada ao seu receptor transmembrana IL-6R e ao complexo transdutor de sinal, exerce efeitos sobre a hematopoiese, a maturação de linfócitos B e na ativação de células T. Atua também diminuindo os níveis de ferro e promovendo a maturação dos megacariócitos. A interação entre IL-6 e as células endoteliais regula o recrutamento de leucócitos e expressão de quimiocinas, como a IL-8 (SCHELLER *et al.*, 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; TURNER *et al.*, 2014).

As quimiocinas são pequenas moléculas primariamente descritas como citocinas quimioatraentes e apresentam um importante papel na biologia dos leucócitos e outros tipos celulares, controlando a homeostase tecidual, recrutamento e ativação celular. Durante o processo inflamatório, são primariamente produzidas pelas células com o objetivo de recrutar leucócitos para o sítio da infecção e lesão. Elas induzem a expressão de integrinas como a LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*) o que favorece a diapedese através do endotélio (RUSSO *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2014). As células endoteliais são importantes produtoras da quimiocina IL-8, também conhecida por CXCL8, cujo principal papel na inflamação é ser responsável pelo recrutamento de neutrófilos. Além deste papel, esta quimiocina também é responsável pela migração quimiotática e ativação de monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos nos sítios inflamatórios. A ligação entre a IL-8 e seu principal receptor CXCR1 o qual é acoplado à uma proteína G resulta na ativação de vias de sinalização intracelular estimulando a degranulação e a expressão de moléculas adesivas, como a integrina Mac-1 (*macrophage-1 antigen*) nas células alvo (TURNER *et al.*, 2014).

3.2.2.4 - Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Produzidas por diversas células incluindo as endoteliais, as espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) são moléculas produzidas no metabolismo aeróbico normal como espécies intermediárias da quebra do oxigênio molecular. O termo ROS abrange moléculas como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No meio intracelular, são produzidas no citoplasma, membrana celular, retículo endoplasmático, no peroxissomo pela cadeia transportadora de elétrons e no citocromo P450 como parte da função metabólica normal. Elas também são geradas especificamente por enzimas denominadas NADPH oxidases e servem como sinalizadores intracelulares no crescimento, adesão, diferenciação e morte. Fazendo referência ao próprio nome, a reatividade das espécies de oxigênio resultado do desequilíbrio entre ROS e as defesas antioxidantes em casos de disfunção celular e estresse causam efeitos deletérios em várias moléculas, incluindo proteínas, lipídeos, RNA e DNA (MITTAL *et al.*, 2014; FORRESTER *et al.*, 2018).

Além do seu papel na iniciação e progressão da inflamação, as espécies reativas de oxigênio participam também da fase resolutive da inflamação. A geração de ROS regula a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1, P e E-selectinas na superfície das células endoteliais, fato que assegura sua interação com os leucócitos circulantes e posterior migração. As espécies reativas de oxigênio também afetam a permeabilidade endotelial. Proteínas das junções firmes como as ocludinas são diretamente afetadas pelo estresse oxidativo. Nesta mesma condição, as junções aderentes também perdem a sua integridade e o aumento de ROS leva à fosforilação de VE-caderina e β -catenina (CHELOMBITKO, 2018).

As células normalmente conseguem se defender contra o dano causado por ROS mediante a ação dos antioxidantes endógenos. As moléculas antioxidantes podem diretamente reagir com as espécies reativas se transformando em radicais menos ativos e menos danosos. Muitos antioxidantes podem reagir diretamente sobre as espécies ou radicais intermediários produzidos por elas e inibir a reação em cadeia e o dano induzido pela mesma. Uma outra função dos antioxidantes é regular as enzimas relacionadas às espécies reativas atuando na inibição da expressão de enzimas que as produzem, como a NAD(P)H oxidase ou aumentando a atividade e

expressão de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) (LÜ *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a investigação por substâncias antioxidantes com o intuito de diminuir a geração de ROS na inflamação aumentou drasticamente. Porém, a ação não seletiva destas substâncias compromete sua eficácia. Isto também aliado ao fato de o tratamento tardio não conseguir reverter os sintomas bem como o estado de oxidação ser diferente entre as doenças. Em associação a estes fatores, é importante mencionar que vários mecanismos intracelulares são susceptíveis às mudanças da concentração de ROS, incluindo muitos mecanismos anti-inflamatórios. Logo, esta sinalização mediada por ROS pode ser anti- ou pró-inflamatória. Portanto é necessário entender melhor todo o processo em várias doenças para que novas terapias antioxidantes sejam desenvolvidas (FIRUZI *et al.*, 2011; INGRAM; DIOTALLEVI, 2017).

3.2.2.5 - Moléculas de adesão celular

A migração de células inflamatórias através do endotélio é mediada por interações adesivas envolvendo moléculas de adesão celular expressas em células endoteliais e leucócitos sanguíneos. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar no sítio inflamatório. O extravasamento destas células pela barreira endotelial ocorre na maioria das vezes por via paracelular. Existem três famílias de moléculas de adesão que são cruciais para a transmigração de leucócitos, são elas: as selectinas, as integrinas e as ICAMs (*intercellular adhesion molecules*), as quais são membros da superfamília de imunoglobulinas (MITTAL *et al.*, 2014).

As selectinas são glicoproteínas de membrana expressas nas células endoteliais bem como nos leucócitos e são de três tipos diferentes: P-selectina, L-selectina e E-Selectina. A P-selectina é expressa na membrana de megacariócitos e células endoteliais sendo estocada nos grânulos das plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais. Mediadores como trombina, histamina e o complemento induzem a redistribuição desta selectina na membrana e outros mediadores como o TNF- α aumentam a transcrição desta. A L-selectina é expressa na superfície de todos os leucócitos. Já a E-selectina é constitutivamente expressa na superfície de células endoteliais da medula óssea e da pele. No entanto, na maioria

dos órgãos, as células endoteliais necessitam do estímulo com TNF- α , LPS ou IL-1 β para sintetizarem selectina (McEVER, 2015). Estas glicoproteínas são caracterizadas por um domínio que reconhece carboidratos, denominado lectina, que permite ligação de baixa afinidade a antígenos *syallil Lewis-x*, que têm um papel importante na captura e rolamento de leucócitos. O PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) é expresso constitutivamente em neutrófilos e linfócitos T e se liga primariamente à P-selectina embora também se ligue as outras duas. A E-selectina também se liga à L-selectina e ao ESL-1 (*E-selectin ligand-1*), que é indispensável no rolamento de neutrófilos. Ligantes para a P-selectina incluem o PSGL-1 e o CD34 (LEY *et al.*, 2007; MITTAL *et al.*, 2014). As interações das selectinas com seus ligantes permitem a adesão dos leucócitos ao endotélio ativado em condições de fluxo sanguíneo pelo fato de se ligarem e se desligarem, determinando a velocidade na qual estas ligações são formadas e quebradas, respectivamente (LEY *et al.*, 2007).

Compostas por cadeias *alfa* (α) e *beta* (β) e expressas por diversos tipos celulares incluindo os leucócitos, as integrinas são proteínas heterodiméricas que facilitam a aderência firme ao endotélio vascular. Elas podem ser agrupadas com base nas propriedades ligantes ou na composição das suas subunidades. A família das β_1 integrinas mediam a adesão dos neutrófilos a proteínas da matriz extracelular como a fibronectina. A $\alpha_9\beta_7$ ou a $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) são ativadas mediante a ativação de neutrófilos e se ligam à VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). Entretanto, a adesão mediada por estas integrinas tem um papel limitado na adesão e migração de neutrófilos quando comparadas com as β_2 . As β_2 integrinas estão envolvidas no aumento da adesão firme e migração transendotelial dos leucócitos. A Mac-1 ($\alpha_m\beta_2$) e a LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) se ligam à ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule 1*). Em contraste com a adesão mediada por selectinas, a adesão através das integrinas é mais firme e indispensável para a migração celular (MITTAL *et al.*, 2014).

A superfamília das imunoglobulinas (Ig) é uma das maiores e mais diversas. Membros desta família influem o complexo de histocompatibilidade principal classe I e II, receptores virais e glicoproteínas de superfície celular. A característica definitiva dos membros desta família é a presença de um ou mais domínios imunoglobulina (Ig). A ICAM-1 e a VCAM-1 fazem parte desta família (SOROKA; KASPER; POULSEN, 2010).

Composta por 5 domínios Ig, a ICAM-1 (CD54) é uma glicoproteína ligada à membrana e tem um papel central na migração e ativação de leucócitos. É expressa em leucócitos, plaquetas, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Em condições não-inflamatórias, sua expressão é constitutivamente baixa, geralmente detectada apenas em células endoteliais, entretanto citocinas como TNF- α aumentam sua expressão. A ligação da LFA-1 dos neutrófilos à ICAM-1 nas células endoteliais culminam no sucesso da migração transendotelial dos leucócitos (van BUUL; KANTERS; HORDIJK, 2007; RAMOS; BULLARD; BARNUM, 2014).

3.2.2.6 - Transmigração de leucócitos

A mobilização do leucócito do sangue para o local da agressão tecidual e seu subsequente acúmulo no tecido é um evento fundamental para resposta inflamatória. O endotélio ativado expressa moléculas adesivas em sua superfície de membrana que permitem uma interação com os leucócitos, resultando em adesão e migração através da monocamada endotelial. O recrutamento de leucócitos é um processo dinâmico e requer que estas células interajam com a parede vascular em condições de fluxo contínuo (LIU *et al.*, 2004; KELLY *et al.*, 2007).

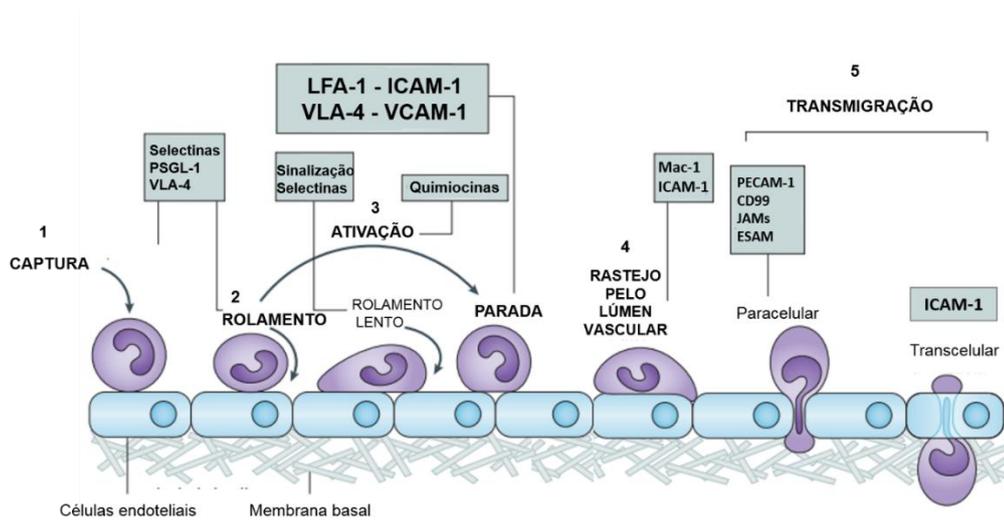
A interação inicial dos leucócitos com as células endoteliais é conhecida como *tethering* ou captura, e o movimento subsequente rotacional ao longo da superfície vascular é denominado de rolamento. Estes eventos são dependentes das selectinas. A P-selectina está envolvida no recrutamento inicial dos leucócitos durante a resposta inflamatória e é expressa na membrana das células endoteliais em resposta ao aumento de cálcio intracelular (KELLY *et al.*, 2007; POBER; SESSA, 2007). O rolamento é mediado pela L-selectina, P-selectina, E-selectina e pela integrina VLA-4, juntamente com a interação das selectinas com ligantes glicosilados como o PSGL1 (FIGURA 6) As interações das selectinas com seus ligantes permitem a adesão dos leucócitos ao endotélio ativado (LEY *et al.*, 2007).

Em seguida, quimiocinas, como a IL-8, são liberadas pelas células endoteliais e se ligam ao seu receptor nos leucócitos ativando as integrinas por meio de uma mudança em sua conformação para a forma ativa (MITTAL *et al.*, 2014). Posteriormente, as integrinas ativadas se ligam às imunoglobulinas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, ambas expressas pelas células endoteliais ativadas (LEY *et al.*, 2007).

A migração de todos os leucócitos depende proeminentemente das β_2 integrinas (Mac-1 e LFA-1) e de ICAM-1, seu ligante nas células endoteliais. No entanto, as integrinas VLA-4 e $\alpha_9\beta_7$ se ligam ao VCAM-1 e também têm seu papel na adesão (KELLY *et al.*, 2007). Imediatamente após a adesão, os leucócitos rastejam pelo lúmen do vaso antes da migração (KELLY *et al.*, 2007). Este processo é mediado através da ligação da integrina Mac-1 a ICAM-1 (FIGURA 6) (LEY *et al.*, 2007).

Algumas moléculas de junção endotelial mediam ativamente a migração transendotelial. Estas moléculas incluem PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), CD99, ICAM-1, ICAM-2, JAM-A, JAM-B e JAM-C e a ESAM (FIGURA 6). A sinalização entre as moléculas de junção pode promover a migração leucocitária por meio da diminuição do contato adesivo entre as células endoteliais, característica da transmigração paracelular. A migração transcelular também pode ocorrer e é mediada por ICAM-1 (FIGURA 6). Quando os leucócitos deixam o vaso para entrar no sítio inflamatório, a maioria se comprime entre as células endoteliais, se movendo de forma amebóide até o tecido (LEY *et al.*, 2007; MICHIELS, 2003).

FIGURA 6 – Esquema da adesão e migração de leucócitos no leito vascular.



1 – Captura dos leucócitos no leito vascular mediada pela ligação das selectinas aos seus respectivos ligantes; 2 – Rolamento dos leucócitos também mediado pelas selectinas; 3 – Ativação destes leucócitos por meio de quimiocinas liberadas pelas células endoteliais estimuladas; 4 – Rastejo dos leucócitos pelo lúmen mediado pela ligação entre a Mac-1 nos leucócitos e a ICAM-1 no endotélio; 5 – Transmigração destes leucócitos pela via paracelular e transcelular. Fonte: Adaptado de LEY *et al.*, 2007. *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews: Immunology, (7): 678-689.

3.3– Terapia da inflamação

3.3.1 - Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

A habilidade de tratar condições de febre e inflamação datam de centenas de anos com o médico Hipócrates, que prescrevia a casca e as folhas de salgueiro para seus pacientes. No século XVII a salicina foi identificada como a responsável pela ação anti-inflamatória e antipirética do salgueiro. Consequentemente, foi iniciada na Alemanha a produção em massa de ácido salicílico e logo depois o ácido acetilsalicílico foi introduzido no mercado pela Bayer em 1899. Porém, o mecanismo da ação anti-inflamatória e analgésica permaneceu desconhecido até o final da década de 60. Nos anos 70, John Vane e colaboradores, elucidaram o mecanismo de ação da aspirina e de outros AINEs através da inibição da síntese de prostaglandinas (RAO; KNAUS, 2008; STEINMEYER, 2000).

As prostaglandinas são mediadores lipídicos amplamente produzidos e atuam de forma autócrina e parácrina com o propósito de manter a homeostase do organismo. Geralmente os níveis de prostaglandinas são mais baixos em tecidos não inflamados, porém estes níveis aumentam durante a inflamação aguda antes do recrutamento de leucócitos (RICCIOTI; FITZGERALD, 2011). Estes mediadores lipídicos são formados pelo ácido araquidônico (AA) liberado da membrana plasmática pelas fosfolipases (PLAs) mediante a ação de enzimas conhecidas ciclooxigenases (COX).

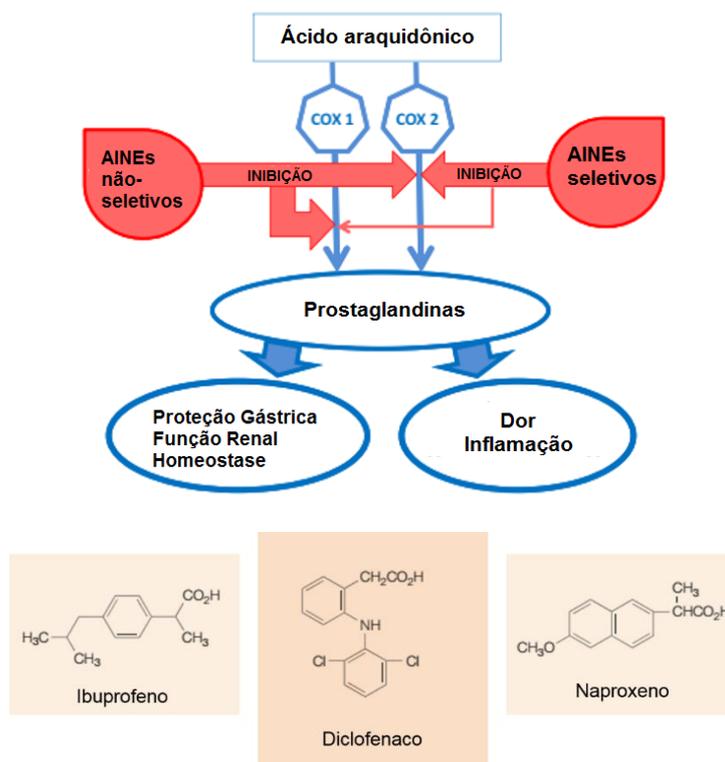
Existem três isoformas de COX, nomeadas de 1 a 3. A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, regula processos fisiológicos como proteção gástrica, função renal e agregação plaquetária. É conhecida como enzima *housekeeping* (AL-TURKI *et al.*, 2010). A COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, hormônios e é a fonte mais importante da formação de prostanóides na inflamação e em doenças proliferativas como o câncer (RICCIOTI; FITZGERALD, 2011; OSAFO *et al.*, 2017). A COX-3, descoberta por Simmons e colaboradores em 2002, apresenta uma maior sensibilidade ao paracetamol (ZARGHI; ARFAEI, 2011). O principal mecanismo dos AINEs é a inibição das COX-1 e 2, resultando na diminuição das prostaglandinas culminando nos seus efeitos analgésico, anti-inflamatório e antipirético (WONGRAKPANICH *et al.*, 2018.).

Apesar da variedade extensa de tratamentos para inflamação, o mais comum ainda é o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Estes fármacos são utilizados para a inflamação aguda bem como para a crônica e são eficazes na maioria dos casos. Foram descobertos mais de 40 tipos de AINEs que são divididos em classes de acordo com sua estrutura e risco. Mais de 30 milhões de pessoas fazem uso destes fármacos e este número cresce significativamente (HALEY; von RECUM, 2019; BJARNASON *et al.*, 2018).

3.3.1.1– AINEs não seletivos, seletivos e seus efeitos adversos

Inseridos em uma classe de fármacos, os anti-inflamatórios não esteroidais compreendem os inibidores da COX não seletivos e os inibidores seletivos da COX-2 (FIGURA 7). Estes fármacos são eficazes em uma diversidade de problemas clínicos, incluindo osteoartrite, inflamação pós-operatória, vasculite, tromboflebite, artrite reumatoide, gota, dismenorreia, dor de dente e de cabeça (STEINMEYER, 2000; ONG *et al.*, 2007). O diclofenaco e o ibuprofeno (FIGURA 7) são os AINES não seletivos mais utilizados no mundo seguidos por naproxeno (FIGURA 7), indometacina, piroxicam e cetoprofeno (HALEY; von RECUM, 2019).

FIGURA 7 – Mecanismo de ação dos AINEs seletivos e não-seletivos e estrutura química de AINEs não seletivos mais utilizados.

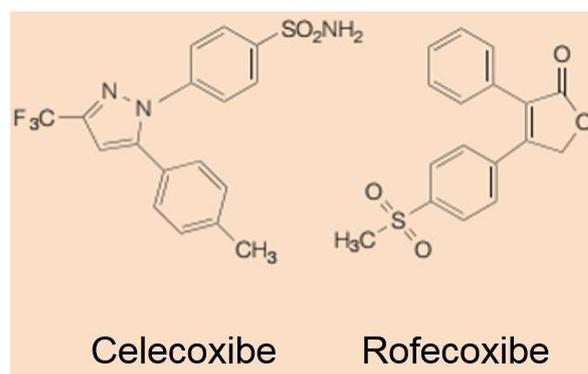


A) Adaptado de: SLIM *et al.*, 2016. *Colonic anastomoses and non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Journal of Visceral Surgery. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2016.06.011>>. B) Adaptado de FLOWER, 2003. *The development of Cox-2 inhibitors*. Nature Reviews: Drug Discovery 2: 179-191.

Apesar da efetiva ação na diminuição da dor e do processo inflamatório, os AINEs não-seletivos são associados com variados efeitos adversos. Além disto, o uso crônico destes fármacos também é associado a uma baixa responsividade ao tratamento. A utilização dos AINEs a longo prazo pode acarretar em complicações cardiovasculares caracterizadas por aumento da pressão arterial, retenção de sódio e água, falência cardíaca congestiva e fibrilação atrial (SCHELLACK; SCHELLACK; FOURIE, 2015). Outros efeitos incluem alterações na função renal, lesão hepática, inibição plaquetária, a qual pode resultar em sangramento. Porém, o efeito mais proeminente é o aparecimento de desordens gastrointestinais, que compreendem desde dor e queimação e, em uso crônico, casos mais severos como hemorragia, perfuração e obstrução gastrointestinais (STEINMEYER, 2000; ONG *et al.*, 2007).

Devido aos efeitos adversos causados pelos AINEs não-seletivos fármacos inibidores seletivos da COX-2 foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir os efeitos na mucosa gástrica em conjunto com uma maior capacidade anti-inflamatória e analgésica. No ano de 1999, a indústria farmacêutica Pfizer iniciou a comercialização do primeiro fármaco inibidor da COX-2, o celecoxibe (FIGURA 8). Posteriormente, o rofecoxibe (FIGURA 8) foi lançado pela Merck. Conjuntamente, estes fármacos atingiram a marca de bilhões de dólares após o primeiro ano de lançamento. Entretanto, estudos seguintes demonstraram que estes inibidores seletivos poderiam estar alterando o balanço natural entre prostaglandinas pró e antitrombóticas, aumentando o risco cardiovascular. Com isto, o rofecoxib foi retirado do mercado. O celecoxibe, etoricoxibe e outros inibidores seletivos são comercializados, mas estão inclusos na lista de substâncias sujeitas ao controle especial (RAO; KNAUS, 2008; ANVISA, 2008).

FIGURA 8 – Estrutura química dos dois principais inibidores da COX-2.



Fonte: Adaptado de FLOWER, 2003. *The development of Cox-2 inhibitors*. Nature Reviews: Drug Discovery, 2: 179-191.

3.3.2 - Glicocorticoides

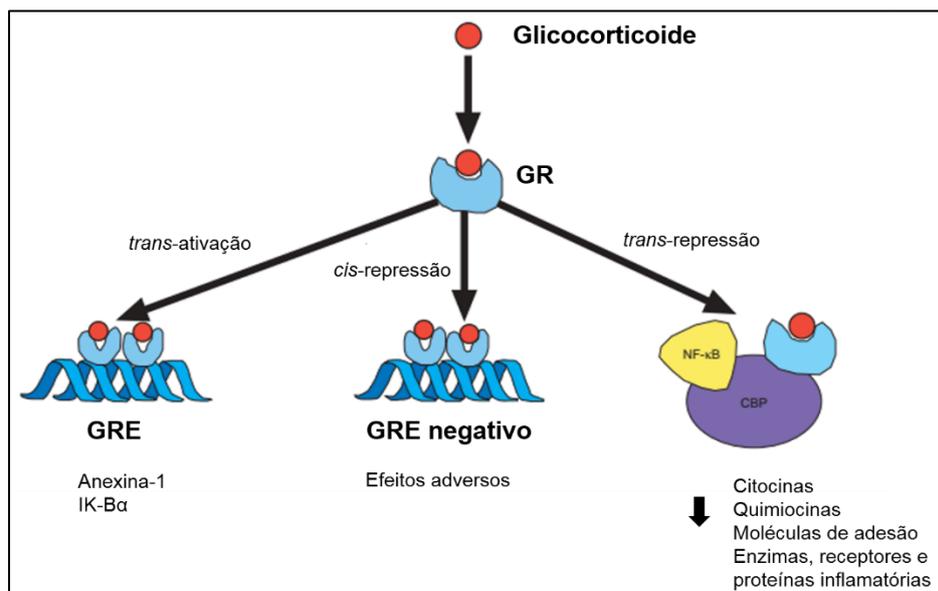
Os corticosteroides são uma classe de hormônios esteroidais liberados pela glândula adrenal, que engloba os glicocorticoides e os mineralocorticoides. Entretanto, o termo "corticosteroides" é geralmente utilizado para se referir aos glicocorticoides. Estes hormônios regulam diversas funções celulares incluindo desenvolvimento, homeostase, metabolismo, cognição e inflamação. Em decorrência de sua ação imunomoduladora, os glicocorticoides estão entre os fármacos mais utilizados no mundo em uma diversidade de doenças inflamatórias e autoimunes como asma, alergias, artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e esclerose múltipla (BARNES, 2006a; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI; 2016). A hidrocortisona, prednisona, dexametasona e betametasona são exemplos de glicocorticoides utilizados terapêuticamente (GENSLER, 2012).

O efeito predominante dos glicocorticoides é diminuir a expressão de vários genes pró-inflamatórios que foram ativados durante a agressão tecidual. Em maiores concentrações, eles têm efeitos adicionais na síntese de proteínas anti-inflamatórias e efeitos pós-genômicos (BARNES, 2006b). É necessária a ligação dos glicocorticoides ao seu receptor citoplasmático para exercer suas ações. O receptor glicocorticoide (GR) é expresso em quase todos os tipos celulares. Este receptor possui três domínios funcionais, o de transativação N-terminal (NTD), um central de ligação ao DNA (DBD) e um domínio com um ligante C-terminal (LBD). Embora apenas um gene seja responsável por codificar o GR, existem duas isoformas, a GR α e a GR β . A GR α se liga aos glicocorticoides, contudo, a GR β não pode ser ativada por estes ligantes em comparação com a GR α e apresenta baixa expressão (KUMAR; THOMPSON, 2005; BARNES, 2006a).

O receptor GR ativado e já translocado para o núcleo se liga ao DNA em sequências específicas na região promotora dos genes responsivos conhecida como elementos de resposta glicocorticoide (GRE). Duas moléculas de GR ligadas como um homodímero se ligam ao GRE, levando a mudanças na transcrição gênica (*trans*-ativação), porém, concomitantemente, são ativados elementos negativos de resposta glicocorticoide (GRE negativos), os quais levam a supressão gênica (*cis*-repressão) e são relacionadas com seus efeitos adversos (BARNES, 2006b) (FIGURA 9).

Adicionalmente, o GR ativado pode interagir com o NF- κ B (FIGURA 9) e a AP-1, inibindo a ação transcricional destas duas proteínas (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI; 2016). Entre os genes que tem sua transcrição aumentada pelos glicocorticoides estão a anexina-1, conhecida como lipocortina-1, inibidora da fosfolipase A2; o I κ B-a, um antagonista para o receptor de IL-1 e o receptor B₂ adrenérgico. De forma oposta, os glicocorticoides diminuem a expressão de genes para citocinas (IL-1, IL-6, IL-9 e TNF- α), quimiocinas (IL-8, RANTES, MCP-1, eotaxinas), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), enzimas inflamatórias (ex.: COX-2 induzida) e peptídeos (ex.: endotelina-1) (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; BARNES, 2006b).

Figura 9 – Mecanismo de ação nuclear dos glicocorticoides.



Fonte: Adaptado de BARNES, 2006. *Corticosteroid effects on cell signaling*. European Respiratory Journal, (27): 413-426.

Os GR possuem ainda ações não genômicas e utilizam a atividade de várias quinases, como AKT e as MAPKs. A ligação do glicocorticoide não ativa somente seu receptor, mas também libera proteínas acessórias que participam em cascata secundária de sinalização, que resultam na inibição da atividade da fosfolipase A2, ativação da anexina-1 e dificulta a liberação do ácido araquidônico. Essas ações não genômicas adicionam uma maior complexidade e diversidade às ações biológicas dos glicocorticoides (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016). Esta diversidade e

complexidade está associada, sobretudo no uso crônico, a efeitos adversos severos, incluindo osteoporose, atrofia muscular, dislipidemia, hipertensão, trombose, sangramento gastrointestinal, pancreatite, imunossupressão, aumento da retenção de sódio e excreção de potássio (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; GENSLER, 2012). O aparecimento destes efeitos também pode ser acompanhado por resistência ao tratamento. Portanto, em função dos efeitos adversos associados ao uso dos AINEs e glicocorticoides associado ao uso imprescindível de fármacos que atuem na resposta inflamatória seja aguda ou crônica, existe a necessidade iminente da busca de novas moléculas mais seguras e eficazes para o tratamento da inflamação.

3.3.3 - *Novos alvos terapêuticos*

Em consequência dos efeitos adversos apresentados pelos anti-inflamatórios clássicos e amplamente utilizados, a terapia direcionada ao alvo terapêutico específico vem ganhando evidência. O grande foco está no desenvolvimento de moléculas que atuem diretamente sobre um alvo específico ou via de sinalização, como inibidores do TNF- α , da IL-1, IL-6 e moléculas de adesão (integrinas α_4) assim como da via das MAP kinases, da JAK/STAT e do NF- κ B (McCULLOCH; DOWNEY; GABALAWY, 2006; SZOLLOSI *et al.*, 2018). Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para a regulação farmacológica de IL-1 e TNF- α através do bloqueio do receptor, interferência com a função da citocina ou inibição da sua produção, processamento e liberação. Os inibidores de TNF- α e IL-6 etanercepte e tocilizumab, respectivamente, são utilizados para artrite reumatoide. Administrado diariamente por via subcutânea, a anakinra é uma versão do inibidor de IL-1, o IL-1RA. Antagonistas de E-selectina têm sido usados em testes clínicos para o tratamento de crise falciforme e como adjuvantes no tratamento de mieloma múltiplo e leucemia mieloide aguda (SILVA; VIDEIRA; SACKSTEIN, 2018). Em associação aos fármacos já comercializados, outras moléculas que atuam nestas e em outras vias estão em testes pré-clínicos e clínicos (McCULLOCH; DOWNEY; GABALAWY, 2006). Este fato estimula a caracterização de possíveis alvos de ligação para novos candidatos a atuarem inibindo o processo inflamatório.

3.4 - Produtos de origem natural como agentes anti-inflamatórios

Em decorrência dos intensos e deletérios efeitos adversos causados pelos fármacos anti-inflamatórios disponíveis, é de extrema importância científica e clínica a identificação e o desenvolvimento de novas moléculas capazes de exibir ação moduladora eficiente sobre a resposta inflamatória com o mínimo de efeitos adversos. Dentro desta perspectiva, os produtos naturais são considerados uma imensa fonte destas substâncias. Este fato é comprovado pela descoberta da salicilina derivada da casca do salgueiro (gênero *Salix*) e do posterior lançamento do ácido acetilsalicílico (Aspirina®), primeiro anti-inflamatório não-esteroidal e molde para os seus sucessores (RAO; KNAUS, 2008; RECIO, ANDÚJAR, RÍOS, 2012).

A presença da atividade anti-inflamatória em plantas medicinais presentes no Brasil é proeminente bem como os metabólitos possivelmente responsáveis por tal atividade e o mecanismo de ação. Isolado do cumaru (*Amburana cearenses*), o amburosídeo A foi capaz de inibir a migração de leucócitos e a produção de TNF- α e prostaglandina E₂. A milonina é um alcaloide isolado das folhas de milona (*Cissampelos sympodialis*) diminui os níveis de IL-1 e TNF- α no peritônio de animais. Estudos com o extrato da folha e do ácido cafeico isolados do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.) revelaram a capacidade de ambos de inibir a produção de IL-6. Outros efeitos exibidos pelas plantas medicinais e seus derivados estão: a inibição da COX-2, da degranulação de neutrófilos, da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de várias citocinas pró-inflamatórias bem como de vias de sinalização como o NF- κ B e o aumento de IL-10, citocina anti-inflamatória (MAIONE *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2018).

As células endoteliais também estão entre os alvos dos derivados naturais com atividade anti-inflamatória. O flavonóide quercetina também atua atenuando o processo inflamatório no endotélio através da redução da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 bem como de MCP-1 (TRIBOLO *et al.*, 2008). O tratamento com o flavonóide galato de epigallocatequina inibiu a secreção de MCP-1 e AP-1 em células endoteliais estimuladas com TNF- α (ZHENG, Y.; TOBOREK, M.; HENNING, B., 2010). O β -sitosterol é capaz de inibir moléculas adesivas (VCAM-1 e ICAM-1) assim como a adesão de monócitos à células endoteliais. Este fitoesterol também atenua a fosforilação do NF- κ B (LOIZOU *et al.*, 2010).

Embora as plantas sejam destaque na busca de novas substâncias com atividade biológica, outras fontes também são estudadas, como derivados marinhos e fungos. No trabalho publicado em Elsayed e colaboradores (2014) foi demonstrado que os polissacarídeos derivados de cogumelos possuem ação inibidora sobre a produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β , além da supressão da ação da COX e da translocação do NF-KB em leucócitos. O N11, metabólito secundário isolado da *Pseudomonas sp.* marinha mostrou-se capaz de inibir a degranulação de neutrófilos através da redução da fosforilação da P38MAPK e da JNK além de diminuir os níveis de Ca²⁺ intracelular (YANG *et al.*, 2014). O extrato etanólico da alga marrom *Ecklonia cava* inibe o aumento da permeabilidade vascular induzida por LPS, a expressão de moléculas de adesivas, a adesão e migração de monócitos. Este extrato também suprime a produção de TNF- α e a ativação do NF- κ B (KIM; BAE, 2010). Isolado do ouriço-do-mar, o ovothiol A foi capaz de diminuir a expressão de moléculas de adesão e a interação de monócitos com as células endoteliais. Além disto também foi capaz de diminuir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (CASTELLANO *et al.*, 2018). Em 2013 foi reportado por Wei e colaboradores que uma ampla variedade de triterpenos isolados de corais exibem atividades anti-inflamatórias sobre células imunes.

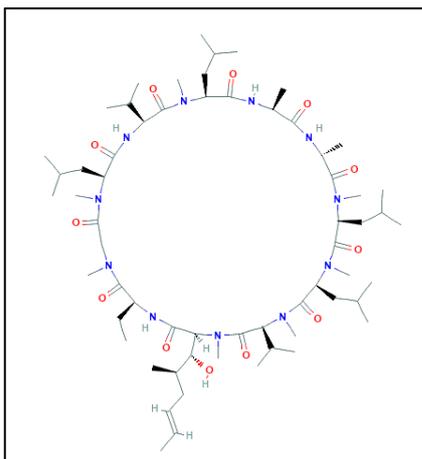
Outras classes de metabólitos secundários detentoras de uma vasta gama de efeitos farmacológicos e terapêuticos são os peptídeos (CHOI; JOO, 2020). Na década passada, houve uma notável expansão para o setor de terapêutica envolvendo os peptídeos. Os avanços nas pesquisas clínicas com essas moléculas durante o final dos anos 90 e 2000 levou às primeiras aprovações pelas agências reguladoras dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) e União Europeia (*European Medicines Agency*, EMA) em 2012 para seis peptídeos. Os peptídeos aprovados, e que já se encontram sendo comercializados são utilizados contra distúrbios gastrointestinais (o linaclotídeo e o teduglutido), para prevenir a síndrome do desconforto respiratório em bebês prematuros (o lucinactante), para tratamento da anemia em pacientes em diálise portador de doença renal crônica (o peginesatídeo), no tratamento da doença de Cushing (o pasireotídeo), e para o tratamento de leucemias (o carfilzomibe) (KASPAR; REICHERT 2013). Portanto, estas informações revelam o potencial terapêutico dos peptídeos, o que estimula a

busca pela caracterização farmacológica de novas estrutura desta classe de moléculas.

3.5 - Peptídeos e dipeptídeos cíclicos

Peptídeos cíclicos são cadeias polipeptídicas que possuem uma estrutura cíclica em anel. Esta estrutura em anel pode ser formada através da ligação entre a porção final de dois peptídeos através de uma ligação amida ou outras também estáveis como lactona e dissulfídica. A ciclização cabeça-cauda (N-C) é a formação da ligação amida entre a porção amino e carboxil terminais. Os fármacos peptídicos possuem vantagens como a alta atividade, baixa toxicidade, resistência enzimática, ausência de efeitos adversos severos e baixa probabilidade de tolerância ou dependência quando comparados aos fármacos não peptídicos. Além disto, a síntese acessível destes peptídeos cíclicos permite uma posterior otimização pela química medicinal (JOO, 2012; GUDASHEVA; OSTROVSKAYA; SEREDENIN, 2018). Estes compostos podem atuar como neurotransmissores, sinalizadores na resposta imune e como hormônios. Fármacos como análogos hormonais (vasopressina, ocitocina, somatostatina, calcitonina), antibióticos (vancomicina, daptomicina, polimixina B, tirocidina, gramicidina S) e o imunossupressor ciclosporina (FIGURA 10), são empregados clinicamente (JOO, 2012; ZORZI; DEYLE, HEINIS, 2017). O ASP2397 é um hexapeptídeo cíclico com atividade antifúngica potente contra espécies do gênero *Aspergillus* (JING; JIN, 2020).

FIGURA 10 – Estrutura química da ciclosporina A.

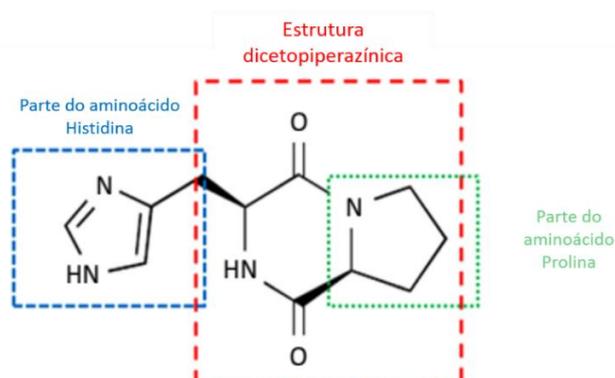


Estrutura química da ciclosporina A, um ciclo peptídeo formado por 11 aminoácidos. Fonte: Retirado de PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclosporin-A>> Acesso em 16 de outubro de 2019.

Um outro exemplo são dipeptídeos cíclicos contendo uma sequência de aminoácidos, como o caso do RGD, composto pela sequência tripeptídica Arginina-Glicina- Aspartato a qual é reconhecida por integrinas para a interação com ligantes extracelulares. Foi descoberto que peptídeos contendo a sequência RGD poderiam inibir o crescimento tumoral e peptídeos cíclicos com essa sequência foram mais potentes, como o ciclo(RGDfV) que é capaz de promover a regressão tumoral induzindo a apoptose de vasos em angiogênese (JOO, 2012). Dentre as aplicações clínicas dos peptídeos cíclicos aprovados pela FDA e/ou EMA nas últimas décadas estão a anemia, inibição da contração uterina, tumores neuroendócrinos, síndrome do intestino irritável, linfoma de células T, diabetes tipo I e II e acromegalia (JING;JIN, 2020).

Os dipeptídeos cíclicos (DCs) também conhecidos como 2,5-dicetopiperazinas são os menores peptídeos encontrados na natureza, e são majoritariamente produzidos por micro-organismos ou obtidos por síntese química. Os DCs são uma classe de compostos orgânicos cíclicos nos quais dois átomos de nitrogênio de um anel piperazina de 6 membros formam ligações amida (FIGURA 11). A estrutura característica dos DCs é um arcabouço gerado pela condensação de dois α -aminoácidos (FIGURA 11) (MARTINS; CARVALHO, 2007; MISHRA *et al.*, 2017).

FIGURA 11 – Estrutura química do dipeptídeo cíclico ciclo(Histidina-Prolina).



O ciclo(Histidina-Prolina) é um dipeptídeo cíclico composto por um aminoácido histidina e um prolina. Em destaque parte da cadeia de ambos os aminoácidos (azul – histidina; verde – prolina) e em vermelho a estrutura dicetopiperazínica central que o caracteriza como dipeptídeo cíclico. Fonte: Adaptado de BELEZZA; PIERCE; MINELLI., 2014. *Cyclic dipeptides: from bugs to brain*. Trends in molecular medicine, (20):551-558.

Assim como os ciclo peptídeos maiores e em comparação aos peptídeos lineares, estas moléculas apresentam maior estabilidade enzimática, rigidez conformacional e melhor seletividade, fatores que, associados com as atividades farmacológicas, contribuem para seu uso como agentes terapêuticos (KATSARA *et al.*, 2006; MISHRA *et al.*, 2017). A partir destas características e diferentes atividades biológicas, diversos dipeptídeos cíclicos passaram a ser isolados e/ou sintetizados. Como exemplo podem ser destacado o ciclo(D-Tirosina-D-Fenilalanina), isolado de *Bacillus* sp., que apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* e *Proteus mirabilis*, além de atividade antitumoral em células A549 (epitélio pulmonar) e capacidade antioxidante (KUMAR *et al.*, 2014). O Ciclo(L-Histidina-L-Fenilalanina) mostrou-se capaz de reduzir a viabilidade de células de carcinoma mamário e câncer cervical (MARTINS; CARVALHO, 2007). Dentre os DCs com atividades biológicas, os que contém prolina prevalecem como o maior grupo. Já o ciclo(Fenilalanina-Prolina) inibe o crescimento células HT-29 (câncer de cólon), HeLa (câncer cervical) e MCF-7 (câncer de mama) e induz apoptose nas células HT-29, indicando uma potencial atividade antitumoral (ORTIZ; SANSINENEA, 2017). O ciclo-(L-Fenilalanina-L-Prolina) possui atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium roqueforti* (STRÖM *et al.*, 2002). Já o ciclo(Serina-Prolina), ciclo(Tirosina-Prolina) e o ciclo(Leucina-Prolina) possuem atividade em bactérias multirresistentes (ORTIZ; SANSINENEA, 2017). Em modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*, os DCs ciclo(L-Prolina-D-Valina), ciclo(L-Prolina-L-Tirosina) e o ciclo (L-Prolina-D-Leucina) apresentaram atividade anti-inflamatória (KANG *et al.*, 2016). Outras atividades dos dipeptídeos cíclicos incluem a alteração nas funções de coagulação (MARTINS; CARVALHO, 2007), antibiofilme e anti-*quorum-sensing* (SIMON *et al.*, 2018; GOWRISHANKAR *et al.*, 2018).

Dentro do grupo dos dipeptídeos cíclicos, os peptídeos contendo glicina e prolina, denominados gliprolinas são farmacologicamente ativos com propriedades antinociceptiva, protetora da mucosa gástrica, inibição da agregação plaquetária e estão associados com a diminuição de mediadores inflamatórios (SAMONINA; ASHMARIN; LYAPINA, 2002; UMAROVA *et al.*, 2011; BADMAEVA *et al.*, 2006). Estudos prévios revelaram que o ciclo(Histidina-Prolina) (FIGURA 11) foi capaz de apresentar um relevante efeito neuroprotetor e anti-inflamatório após lesão cerebral e medular por suprimir a sinalização intracelular mediada por NF-κB (FADEN, 2003;

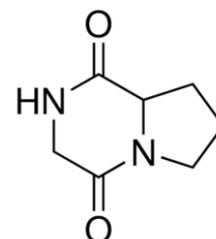
BELLEZZA *et al.*, 2014). Outros peptídeos com o aminoácido glicina em sua estrutura, como o ciclo(Leucina-Glicina) e o ciclo(Histidina-Glicina), têm sido investigados, respectivamente, como agentes terapêuticos na inibição da tolerância induzida por opiáceos e na inibição da agregação plaquetária (BHARGAVA, 1988; LUCIETTO *et al.*, 2006).

3.5.1 - Dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina)

O dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina) (CGP) (FIGURA 12) é originado da fração N-terminal do fator de crescimento semelhante à insulina, IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (GUAN; GLUCKMAN, 2009). O CGP possui capacidade neuroprotetora e estimulatória nos processos de memorização (GUAN *et al.*, 2007; SAMONINA; ASHMARIN; LYAPINA, 2002). Semelhantemente, estudos anteriores demonstraram que o IGF-1 apresenta propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória (BITAR *et al.*, 1996; LEE, 2011), sendo estas resultantes do aumento da captação destes peptídeos em decorrência de sua ciclização (SAMONINA; ASHMARIN; LYAPINA, 2002). Este dipeptídeo detém a capacidade de normalizar a função do IGF-1, aumentando a recuperação de lesão cerebral isquêmica em ratos e também de inibir o crescimento de tumores linfômicos em camundongos. O CGP promove a atividade do IGF-1 quando este é insuficiente e ao mesmo tempo inibe sua atividade quando este fator está em excesso (GUAN *et al.*, 2014). Além disto, o ciclo(Glicina-Prolina) através da ação em receptores opioides diminui a secreção salivar em camundongos (MELO *et al.*, 2020).

FIGURA 12 – Estrutura química do dipeptídeo cíclico ciclo(Glicina-Prolina).

Estrutura do Ciclo Gli-Pro, composto por dois aminoácidos, Glicina e Prolina. Retirado de: FERRO *et al.*, 2015. *Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42, 1287–1295.



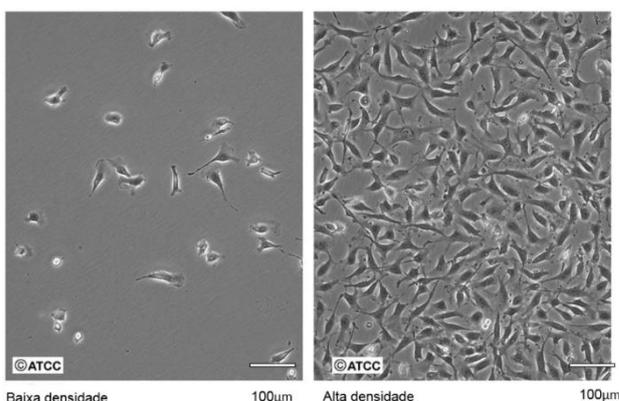
Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo, demonstramos que o CGP foi capaz de apresentar, em modelos de inflamação *in vivo*, efeitos anti-inflamatórios por reduzir tanto a formação do edema quanto o infiltrado de células inflamatórias no tecido após estímulo (FERRO *et al.*, 2015). No entanto, apesar desta caracterização farmacológica *in vivo*, os alvos celulares e moleculares para ação do CGP permanecem para ser identificados. Motivados por esta lacuna de conhecimento, no presente trabalho objetivamos avaliar, *in vitro*, os efeitos do CGP sobre eventos relacionados a resposta inflamatória, como a adesão e ativação endotelial.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

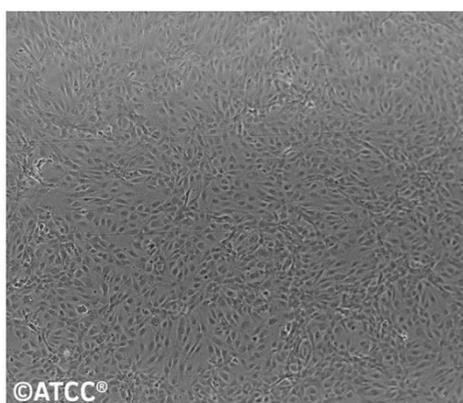
4.1 - Cultivo celular e CGP

Neste estudo foi utilizado as seguintes linhagens de células: EA.hy926 (FIGURA 13), obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) que consiste de um híbrido entre HUVEC (*human umbelical vascular endothelial cell*) e A549 (células epiteliais de carcinoma de pulmão); HUVEC (*primary human umbilical-vein endotelial cells*) (FIGURA 13) e HEK293T (*human embryonic kidney 293T cells*) (FIGURA 13) fornecidas pelo Prof. Stephen J. Hill (Universidade de Nottingham, Reino Unido). Todas as células foram mantidas de acordo com o fornecedor, em condições estéreis em estufa de CO₂ a 37 °C. As células EA.hy926 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) (Gibco® ou Sigma®) suplementado com 10 % de SBF (soro bovino fetal) (Gibco®), 1% de L-glutamina (Sigma®) e 2% da solução de penicilina/estreptomicina (Gibco®) e utilizadas até a passagem 15. As células HUVEC foram cultivadas em meio Medium 200 (M200) (Gibco®) suplementado com 2,2 % de LVES (*Large vessel endotelial supplement*) x50 (Gibco®) e utilizadas até a nona passagem, enquanto as células da linhagem HEK293T foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10 % SBF e utilizadas até a passagem 25. O dipeptídeo cíclico ciclo (Glicina-Prolina) (CGP) foi obtido da Sigma-Aldrich® (C2374, ≥ 98 % de pureza - HPLC) e diluído no respectivo meio de cultivo requerido para cada célula.

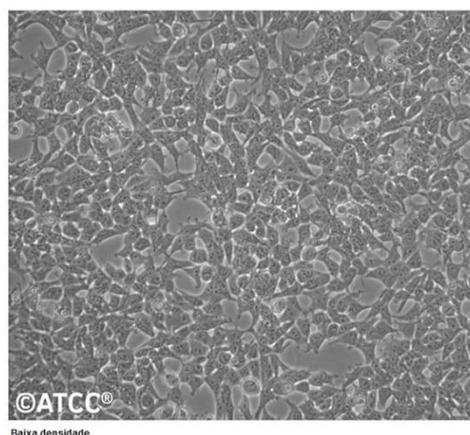
Figura 13 – Característica morfológica das linhagens celulares utilizadas nos experimentos.



A - Fotomicrografias de células EA.hy 926.
Escala: 100 µm. Fonte: ATCC.
<<http://www.lgcstandards-atcc.org>>



B - Fotomicrografia de células primárias HUVEC.
Fonte: ATCC. <<https://www.lgcstandards-atcc.org>>



C - Fotomicrografia de células HEK293T. Fonte: ATCC. <<https://www.lgcstandards-atcc.org>> Acesso em 12 de setembro de 2019.

4.2 - Viabilidade celular

O efeito do CGP sobre a viabilidade das células endoteliais foi aferido utilizando o método de MTT (*3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*) (Sigma®) (MOSMAN, 1983). As células EA.hy 926 foram distribuídas em placa de 96 poços (Corning®) na densidade de 10^4 células/poço. Em seguida, as células foram tratadas com o CGP nas concentrações de 10 a 300 µM e mantidas a 37 °C, em estufa de CO₂. Após o tempo de incubação de 24 horas, o MTT (5 mg/mL) foi adicionado. Decorrido o tempo de 4 h, o sobrenadante foi descartado e 150 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (Celer/Polaris®) a 540 nm. Como controle foi utilizado células sem

tratamento em apenas o veículo DMEM-SBF 10 %. A densidade óptica (DO) foi analisada e a viabilidade celular calculada em porcentagem relativa ao controle sem tratamento utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)}: \left(\frac{\text{DO das células tratadas}}{\text{DO das células não tratadas}} \right) \times 100$$

4.3 - Ensaio de adesão de neutrófilos ao endotélio

As células EA.hy926 foram cultivadas em uma densidade de 8×10^3 células/poço em lamínulas de vidro depositadas em placas de 24 poços (Corning®) e mantidas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24 horas. Antes de cada experimento, as células endoteliais foram tratadas por 1 h com CGP (1-50 µM), e posteriormente mantidas sob estimulação com TNF-α (50 ng/mL) por mais 6 h.

Simultâneo a este tempo de 6 h, neutrófilos humanos foram isolados por gradiente de Percoll® a partir de 20 mL de sangue obtidos por punção venosa de doadores saudáveis. O gradiente foi composto por diferentes concentrações (72 %, 63 %, 54 % e 45 %) de Percoll. Após a adição das diferentes camadas de concentrações de Percoll em um tubo de ensaio de 15 mL foi adicionado 3 mL de sangue. Em seguida, o tubo com o gradiente foi centrifugado por 25 min à 23 °C (527 xg, aceleração e desaceleração 0). Após este procedimento, o anel contendo células formado entre as concentrações de 72 % e 63% foi retirado, e as células homogeneizadas em PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,4) e centrifugadas a 1200 rpm a 12 °C (aceleração e desaceleração 0) por 10 min. No caso em que foram identificadas hemácias, as células foram ressuspensas em solução de PBS contendo NH₄Cl (8,56 mg/mL) para a remoção de hemácias. Ao final, as células foram ressuspensas em meio de cultivo DMEM suplementado com 1% de L-glutamina e 2% de penicilina/estreptomicina. Em seguida, a contagem de células totais (câmara de Neubauer) bem como a contagem diferencial realizada em citocentrifugado foi realizada para identificar a pureza dos neutrófilos. Os experimentos foram realizados com pureza de neutrófilos superior a 90%.

Ao término das 6 horas de estímulo, o sobrenadante das células endoteliais foi removido e os neutrófilos foram adicionados à cultura na proporção de 50 neutrófilos para cada célula endotelial. Esta co-cultura (células endoteliais e neutrófilos) foi

mantida em estufa de CO₂ a 37 °C por 2 horas para permitir a adesão entre as células. Terminado este tempo, o sobrenadante foi retirado e cada poço foi lavado gentilmente com PBS para remover as células não aderidas. As células que permaneceram no poço foram fixadas com metanol, coradas com panótico (Centerlab) e visualizadas em microscópio óptico. O resultado da adesão de neutrófilos (IA) sobre o endotélio foi calculado através da seguinte fórmula (CONTE *et al.*, 2015):

$$AI = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ de células endoteliais com neutrófilos}}{\text{n}^\circ \text{ total de célula endotelial}} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de neutrófilo por célula endotelial}}{\text{n}^\circ \text{ total de célula endotelial}} \right) \times 100$$

4.4 - Expressão de ICAM-1 na membrana das células endoteliais

Utilizando condições de tratamento e estímulo semelhantes ao ensaio de adesão descrito acima, as células endoteliais EA.hy 926 foram semeadas (2×10⁵/poço) em placas de 24 poços (Corning®). Após 24 horas, as células foram tratadas com CGP (5-50 µM) e em seguida estimuladas com TNF-α (50 ng/mL) por 6 horas. Posteriormente as células foram removidas dos poços com tripsina em PBS/SBF 10 % e centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos, 22 °C). Em seguida, as células ressuspendidas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores com PBS/BSA 0,5 %. O *pellet* de células foi marcado com anti-ICAM-1 (eBioscience™) - APC na proporção de 1:100 e mantido em geladeira (4 °C) por 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas com PBS/BSA 0.5 % nas mesmas condições e ressuspendidas com a solução fixadora (PBS/BSA 0.5 % em 2 % de formaldeído). A leitura da fluorescência foi realizada no citômetro de fluxo (FACScanto II, BD) e para a análise dos dados de intensidade de fluorescência foi utilizando o programa Flowing (versão 2.5.1, Turko Centre for Biotechnology).

4.5 – Ensaio de imunofluorescência para E-selectina

As células HUVEC foram cultivadas numa densidade de 2×10⁴ células/poço em placas pretas (Greiner®) em meio M200 2,2 % LVES. Após 24 horas, as células foram tratadas por 1 hora com CGP nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 100 e 200 µM. Em seguida, 1 ng/mL de TNF-α (Sigma®) foi adicionado a cada poço, ficando sob

incubação por mais 4 horas para a marcação da E-selectina. Decorrido este tempo, as células foram lavadas com PBS 1x (Sigma[®]) e fixadas com 3 % de paraformaldeído (Sigma[®]). Para o bloqueio inespecífico foi utilizada uma solução com 3 % de albumina séria bovina (BSA, Sigma[®]) e 1 % de glicina (Sigma[®]) em PBS 1 x. Após lavagem com PBS, as células receberam 10 % de *chicken serum* (soro de galinha) para o bloqueio específico. Em seguida foram marcadas com anticorpo monoclonal para E-selectina (1:2000) (*Mouse Monoclonal*, Sigma[®]) deixadas na geladeira *overnight*. Subsequentemente, as células foram lavadas e submetidas ao anticorpo secundário para E-selectina (*chicken anti-mouse Alexa Fluor 488*[®] Invitrogen[™]) por 1 hora. Após nova lavagem com PBS, as células foram marcadas com H33342 (Sigma[®]) (1:1000) por 10 minutos para aquisição das imagens (aumento de 10x) realizada no leitor de placas *IX Ultra Confocal Plate Reader* e a análise da fluorescência utilizando o Metaxpress 5.3.

4.6 - Quantificação de citocinas inflamatórias

A quantificação de citocinas produzidas por células endoteliais foi realizada através do kit CBA (*cytometric bead array*) (BD[™]), um método que quantifica os analitos através de *beads* de captura conjugadas a anticorpos específicos. Foram analisadas as citocinas IL-6 e IL12-p70 e a quimiocina IL-8. A análise e quantificação foi feita por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD[™]). As células EA.hy926 foram cultivadas em placas de 24 poços (2.5×10⁵ células/poço) (Corning[®]) por 18-24 horas. Em seguida, foram pré-tratadas por 1 h com CGP (5 - 50 µM) e estimuladas ou não com TNF-α (100 ng/mL) por 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e as citocinas foram dosadas de acordo com o protocolo do fabricante.

4.7 - Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As células EA.hy 926 foram semeadas na densidade de 10⁵ células/poço em placas de 24 poços (Corning[®]). Após 24 h, as células foram tratadas com CGP (5-50 µM) por 1 h e posteriormente estimuladas por 30 minutos com 0,25 µM de ionóforo de cálcio (A23187, Sigma[®]) que é um composto capaz de elevar os níveis deste íon no espaço intracelular. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as células foram

marcadas com 10 μM de DCFH-DA (5-(-6)-carboxy-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) - FITC (Sigma[®]) por 30 min. Decorrido este tempo, as células foram removidas com tripsina e PBS/SBF 10 % e a leitura realizada por citometria de fluxo (FACScanto II, BD [™]).

4.8 - Mobilização de Cálcio

Para avaliar a ação do CGP sobre os níveis de cálcio intracelular, foi utilizado o método de mobilização intracelular de cálcio modificado (CONROY et al., 2018). Células HUVEC (2×10^4) foram cultivadas em placas pretas de 96 poços (Corning) e denominadas de *test plate*. No dia seguinte, a histamina (de 6×10^{-10} M a 6×10^{-5} M) foi diluída em probenecida (2,5 mM) em NaOH e HBSS (1 \times contendo 10 mM de glicose), *Brilliant Black* (0,5 mM) e colocada em placa transparente de fundo U (Corning). Esta placa é denominada *compound/source plate*.

As células foram tratadas durante 45 minutos com CGP (1-200 μM) ou mepiramina, inibidor do receptor H₁ (10 nM), diluídos em solução de probenecida (2,5 mM) (Sigma[®]) em NaOH e HBSS (1 \times + Glicose 10 mM), *Brilliant Black* (0,5 mM), Fluo-4 (2,3 μM) (Invitrogen[™]) em ácido plurônico (0,023 %) e HBSS (1 \times + Glicose 10 mM). Em seguida, ambas as placas, juntamente com ponteiras pretas (Molecular Devices, LLC) foram colocadas no leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Devices, LLC). O equipamento foi programado para transferir 20 μL de histamina da *source plate* para a *test plate*, obtendo o volume final de 120 μL por poço. Através do *Softmax Software* os níveis de cálcio intracelular foram avaliados por 120 segundos (intervalo de 1,52 segundos, totalizando 79 leituras por poço). Os valores reduzidos de RFU (*Relative Fluorescence Units*) foram calculados pelo software e normalizados com a média do controle sem histamina como 0 % e a média da maior concentração de histamina como 100 % originando dessa forma a porcentagem de resposta à histamina.

4.9 – Avaliação da migração de células endoteliais

O efeito CGP sobre a migração de células EA.hy926 foi avaliado através do ensaio de migração horizontal (*scratch-wound healing assay*). As células (10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços (Corning[®]) e mantidas em

estufa *overnight*, para a adesão celular e formação de uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência. Em seguida as células foram tratadas com mitomicina (4 µg/mL) por 2 horas. Então, foi realizado um risco linear (*gap*), utilizando uma ponteira de 200 µL e, em seguida, o meio foi desprezado. As células foram lavadas com PBS e tratadas com CGP em diferentes concentrações (1-50 µM) ou apenas meio de cultura (controle). A migração celular foi avaliada mediante a análise das fotomicrografias nos tempos 0 e 24 horas após o risco, utilizando o software Image-J, de modo que foi determinada quantitativamente a distância percorrida pelas células no *gap*. O valor da migração das células em porcentagem foi obtido mediante o seguinte cálculo: Migração (%) = [(A0- At)/A0]x100. Onde A0 é a área no tempo 0 e At é a área no período de tempo após o risco.

4.9.1 - Ensaio de migração por live imaging

Células HUVEC foram (2×10^4) cultivadas em placas pretas de 96 poços (Corning©) em meio M200 suplementado com 2,2 % de LVES. No dia seguinte, foi realizado o risco com auxílio de uma ponteira (1000 µL). Após o risco, as células foram tratadas com VEGF (10 nM) e CGP em concentrações entre 1-200 µM em meio M200 suplementado com 0,1 % LVES. A migração através do risco foi avaliada por *ptychography* durante 48 h no Liveocyte™ Cell Imaging, Phasefocus™. Os dados referentes à migração celular foram analisados pelo software *dashboards* do *analyse module* do equipamento e expressos de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{Área inicial} - \text{Área final}) \times 100}{\text{Área inicial}}$$

4.10 - Ensaio de transferência de energia de ressonância bioluminescente (NanoBRET)

Neste conjunto de experimentos as células HEK293 foram cultivadas (3×10^5) em placas de 6 poços em DMEM com 10 % SBF. No dia seguinte, as células foram transfectadas (1 µg DNA; FUGENE®HD) com os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, β₂, VEGFR2, CXCR4, CXCR7 e H₁ conjugados a nanoluciferase NanoLuc (Promega®). Após 24 horas, as células foram transferidas (1,5 a 3×10^4) em meio DMEM 10 % SBF

para placas brancas (Greiner[®]) anteriormente submetidas a um *coating* com Poli-D-Lisina. Decorridas 24 horas, as células foram tratadas por 2 horas em HBSS 1× (*Hank's Balanced Salt Solution*) contendo glicose (10 mM) e BSA (0,1 %) com os respectivos ligantes fluorescentes e ligantes não-fluorescentes (TABELA 1) e CGP (1-200µM). Em outro experimento semelhante e apenas para os receptores H₁ e β₂, as células foram previamente tratadas por 24 horas com CGP. O substrato NanoLuc furimazina (Promega[®]), na concentração final 10 mM, foi adicionado a cada poço por 5 minutos para permitir a oxidação da furimazina mediada por NanoLuc, resultando em emissão de bioluminescência. As emissões foram monitoradas usando o leitor de microplacas PHERAstar FS (BMG Labtech) utilizando filtros de medição de emissões NanoLuc a 450 nm e emissões de TMR usando um filtro de passagem longa a 550 nm para células NanoLuc-VEGFR2. As taxas de BRET foram calculadas como fluorescência em função das emissões de luminescência, normalizadas e a porcentagem de ligação calculada, com os valores para o ligante fluorescente como valor máximo e de seus respectivos antagonistas como valor mínimo.

TABELA 1 – Receptores, ligantes fluorescentes, ligantes/antagonistas e respectivas concentrações utilizadas no ensaio de nanoBRET.

RECEPTOR	LIGANTE FLUORESCENTE	CONCENTRAÇÃO	LIGANTE NÃO-FLUORESCENTE	CONCENTRAÇÃO
A ₁	CA-XAC	50 nM	DPCPX	10 µM
A _{2A}	CA-XAC	50 nM	ZM24138	10 µM
A _{2B}	CA-XAC	50 nM	PSB603	10 µM
A ₃	CA-XAC	50 nM	MRS1220	10 µM
β ₂	PROPBY630	50 nM	PROPRANOLOL	10 µM
VEGFR2	121-TMR	30 nM	VEGF 121a	30 nM
CXCR4	CXCL12 fluorescente	10 nM	CXCL12	100 nM
CXCR7	CXCL12 fluorescente	10 nM	CXCL12	100 nM
H ₁	AV082	100 nM	MEPIRAMINA	10 µM

4.11 - Análise estatística

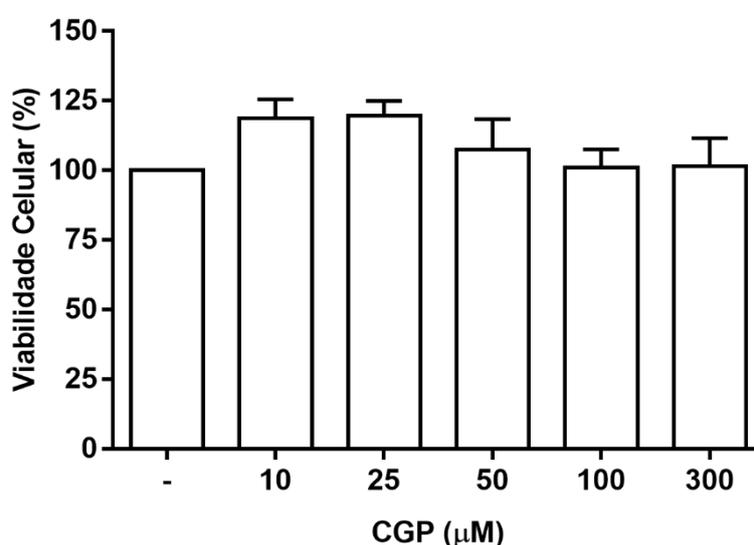
Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism (versão 6.00, GraphPad Prism Software, Inc.). A análise estatística empregada para os ensaios de MTT, Adesão, Migração, geração de ROS, marcação de ICAM-1 e E-selectina e nanoBRET foi a *One-Way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. O experimento por citocinas foi analisado por *Two-way* ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni. Os ensaios de avaliação dos níveis de cálcio foram analisados por *Two-Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey ou Sidak. Os valores são representados pela média \pm erro padrão da média e considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 – RESULTADOS

5.1 – Efeito do CGP sobre a viabilidade de células endoteliais

Inicialmente, buscou-se avaliar o efeito do CGP sobre a viabilidade das células EA.hy926. Utilizando o ensaio de MTT demonstramos que o CGP, em todas as concentrações avaliadas (10-300 μM) não apresentou efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais (FIGURA 14).

FIGURA 14 – CGP não induz efeitos citotóxicos em células endoteliais.



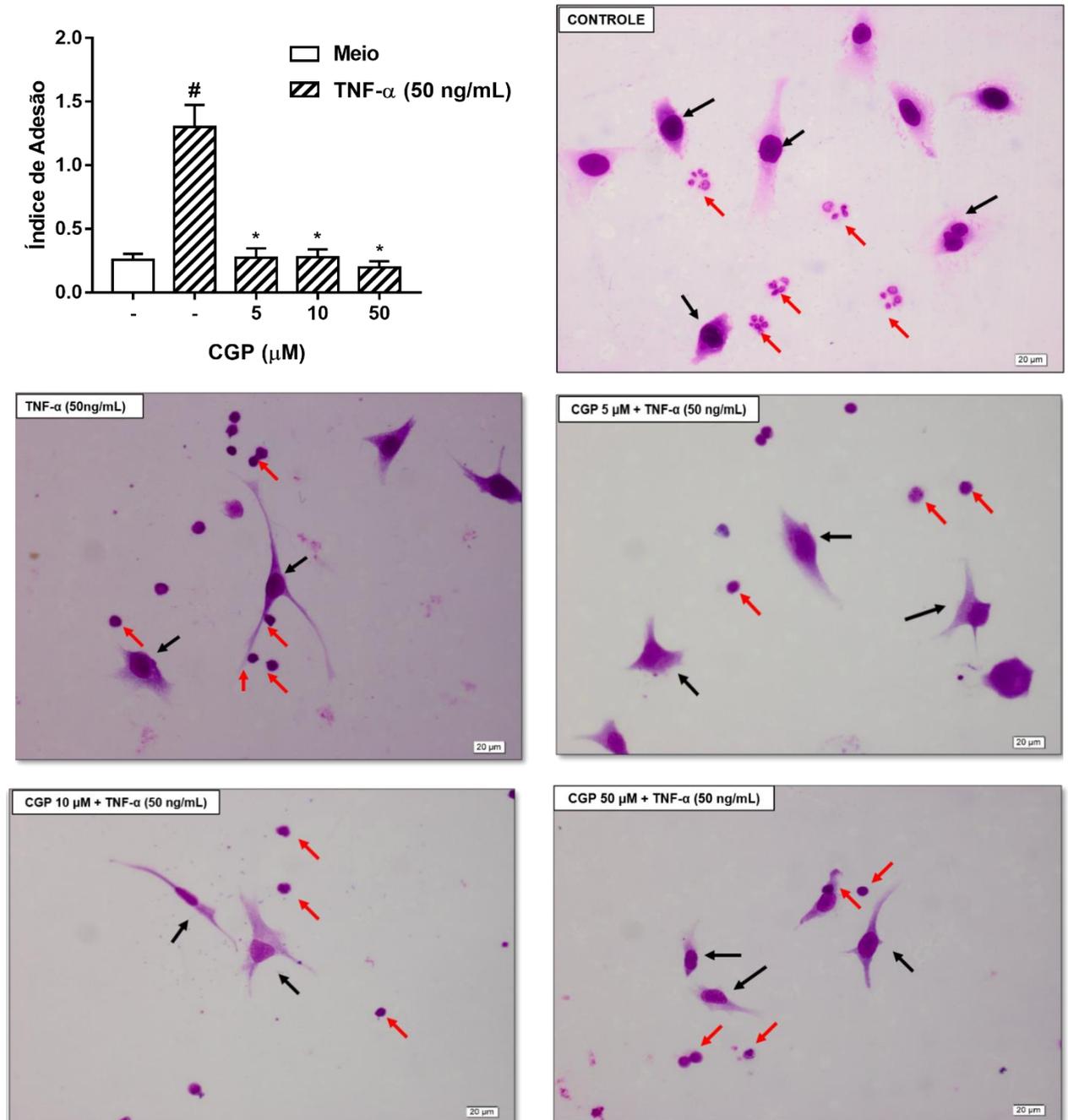
As células endoteliais foram semeadas em placas de 96 poços. No dia seguinte, foram tratadas com CGP nas concentrações de 10 a 300 μM . Após 24 horas, foi adicionado MTT (5 mg/mL) por 4 horas. Em seguida foram adicionados 150 μL de DMSO/poço e a absorbância correspondente à viabilidade foi analisada em um leitor de microplaca a 540 nm. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes, sendo apresentados por média \pm E.P.M analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.2 – Efeito do CGP na adesão endotélio-neutrófilo

Como a superfície das células endoteliais é determinante para adesão, e subsequente transmigração dos leucócitos em direção ao tecido inflamado, decidimos avaliar se a exposição de células endoteliais ao CGP afetaria a interação endotélio-neutrófilos. Como apresentado na Figura 15, células endoteliais estimuladas com TNF- α (50 ng/mL) apresentaram um número maior de neutrófilos aderidos em sua

superfície em relação as células endoteliais usadas como controles que foram tratadas apenas com meio de cultura (DMEM). O tratamento das células endoteliais com o CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μM antes do estímulo com $\text{TNF-}\alpha$ foi capaz de impedir a adesão dos neutrófilos ao endotélio (FIGURA 15).

FIGURA 15 – Adesão de neutrófilos às células endoteliais estimuladas e tratadas com CGP.



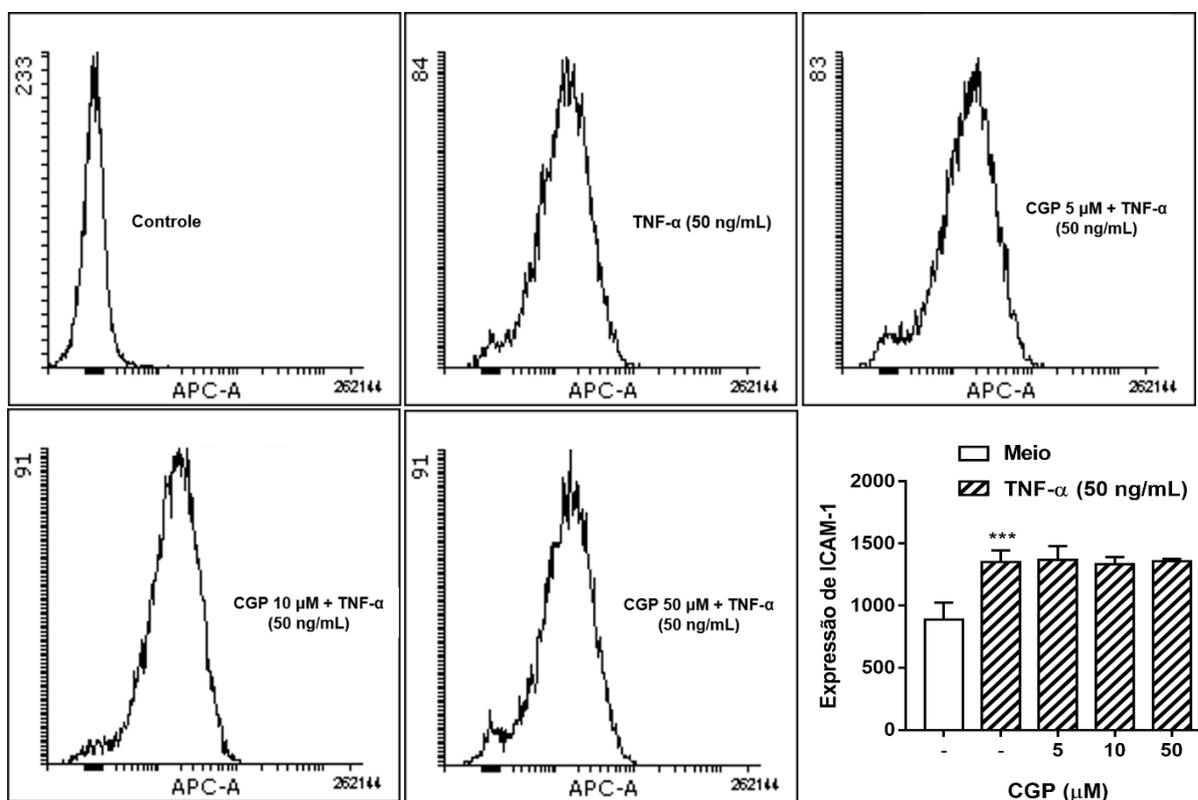
Ensaio de adesão de neutrófilos ao endotélio tratado com CGP e estimulado com $\text{TNF-}\alpha$. As células endoteliais da linhagem EA.hy926 foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. No dia seguinte, estas células foram tratadas com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μM por

1 hora e posteriormente estimuladas com TNF- α (50 ng/mL) por 6h. Após a retirada do sobrenadante, as células foram gentilmente lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com panótico. A contagem dos neutrófilos remanescentes foi realizada em microscópio óptico. No gráfico, as barras representam a média \pm E.P.M analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao endotélio estimulado com TNF- α ; # $p < 0,05$ em relação ao endotélio mantido com DMEM. As fotomicrografias são imagens representativas de cada grupo experimental. Setas em vermelho: neutrófilos; setas em preto: células endoteliais EA.hy926 (aumento 40 x). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.3 – Efeito do CGP na expressão de ICAM-1 em células endoteliais

Como o CGP afetou a adesão de neutrófilos ao endotélio, e considerando a importância das moléculas de adesão para a interação entre o leucócito e o endotélio, decidimos inicialmente avaliar a ação do CGP sobre a expressão de ICAM-1 em células endoteliais tratadas e estimuladas. A estimulação com TNF- α aumentou de maneira significativa a expressão de ICAM-1 na membrana das células endoteliais (FIGURA 16). Entretanto, o tratamento com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μ M não alterou o padrão de expressão desta molécula de adesão (FIGURA 16).

FIGURA 16 - Perfil de expressão de ICAM-1 em células endoteliais estimuladas com TNF- α e tratadas com CGP.



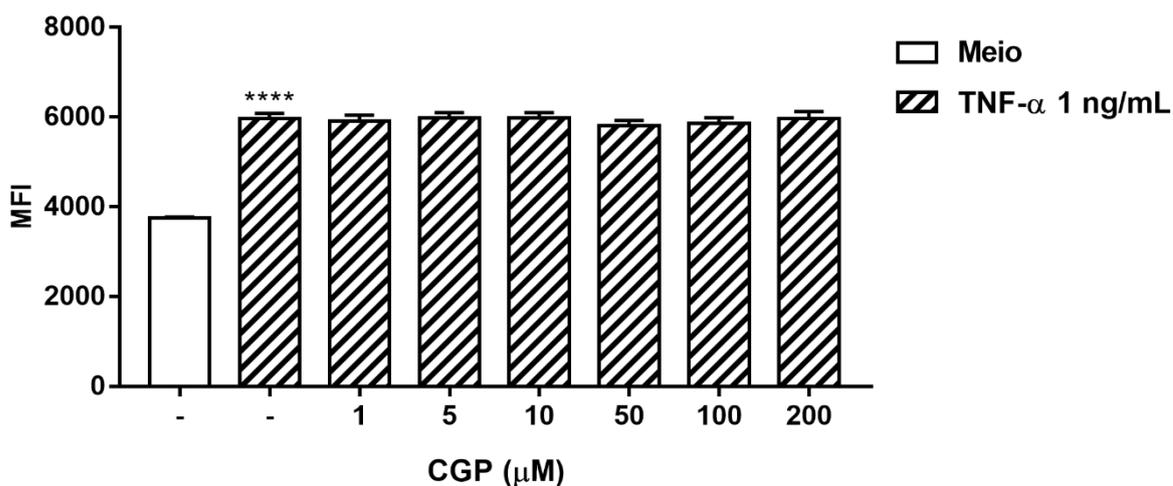
As células endoteliais foram tratadas por 1 h com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μ M. Em seguida, as células foram estimuladas com TNF- α (50 ng/mL) por 6 h. Após este período, as células foram obtidas e marcadas com anti-ICAM-1 (1:100) e posteriormente levadas para análise por citometria de fluxo com o filtro APC. Histogramas representativos da marcação de ICAM-1 em células EA.hy926. No gráfico, a intensidade de fluorescência apresentada por média \pm E.P.M e analisada por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. *** $p < 0,05$ em relação ao controle mantidos com meio DMEM. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5. 4 – Efeito do CGP sobre a expressão de E-selectina

Tendo por base a necessidade de aprofundar as investigações acerca dos possíveis alvos moleculares capazes de responder pelas ações do CGP, estendemos as análises para avaliar se outras moléculas envolvidas ativamente na inflamação seriam sensíveis aos efeitos deste dipeptídeo. Para isso, foram executados uma série de experimentos durante o período de doutorado sanduiche no exterior realizado na Universidade de Nottingham (Inglaterra).

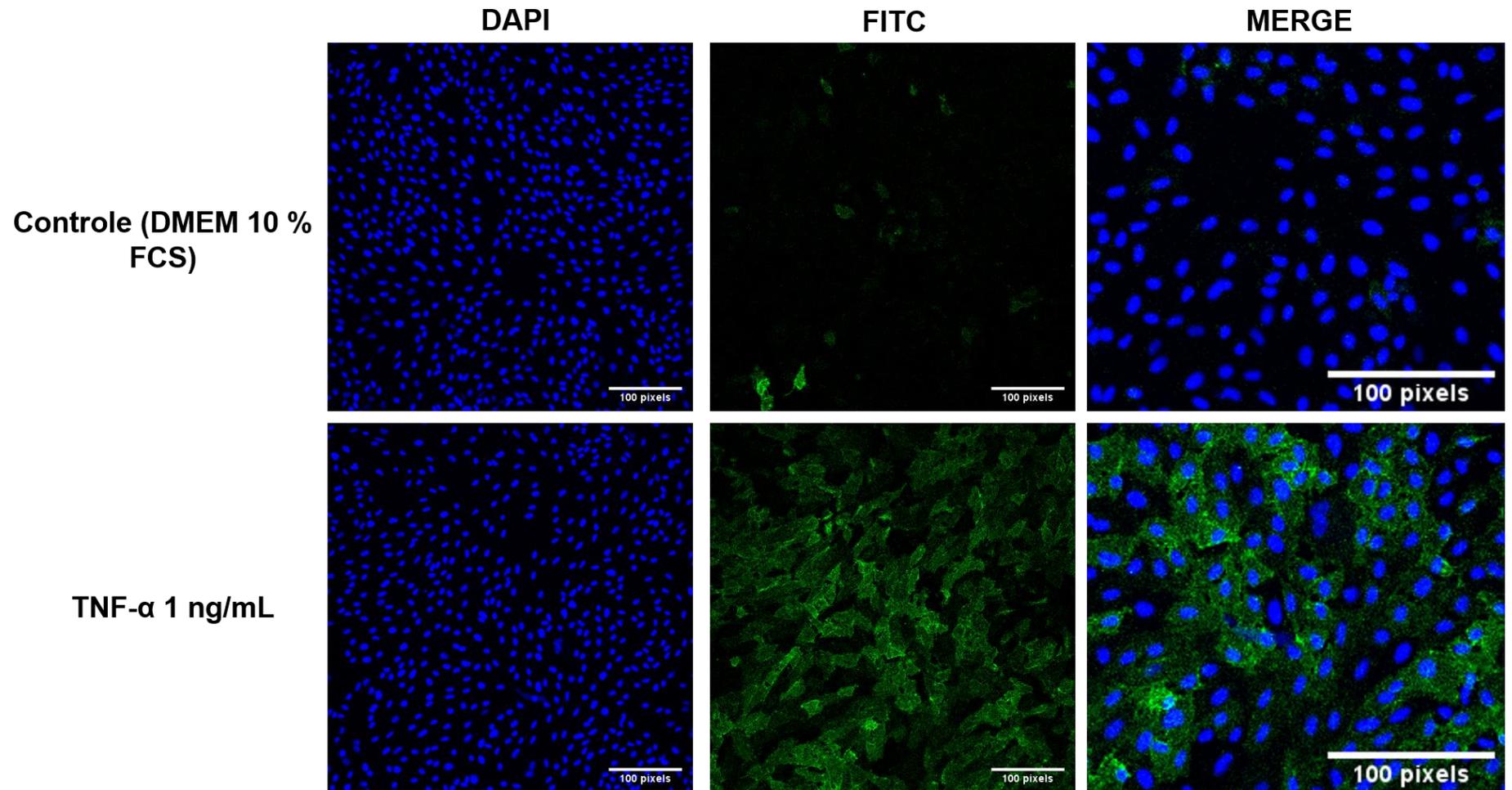
Inicialmente, tendo como base que as selectinas mediam interações iniciais de adesão entre os neutrófilos e o endotélio vascular em áreas de inflamação, avaliamos o efeito do CGP na expressão de E-selectina em células HUVEC. Conforme apresentado na Figura 17, o tratamento com TNF- α induziu um aumento significativo na expressão de E-selectina em células endoteliais. O tratamento com CGP em todas as concentrações testadas não alterou o perfil de expressão de E-selectina em células estimuladas por TNF- α , como demonstram a quantificação da fluorescência e as fotos representativas da imunofluorescência, nas quais a marcação em verde corresponde à E-selectina (mais expressa com o estímulo) e em azul o núcleo das células, marcado com H33342 (FIGURA 17).

FIGURA 17 – Perfil de expressão de E-selectina em células endoteliais estimuladas com TNF- α e tratadas com CGP.



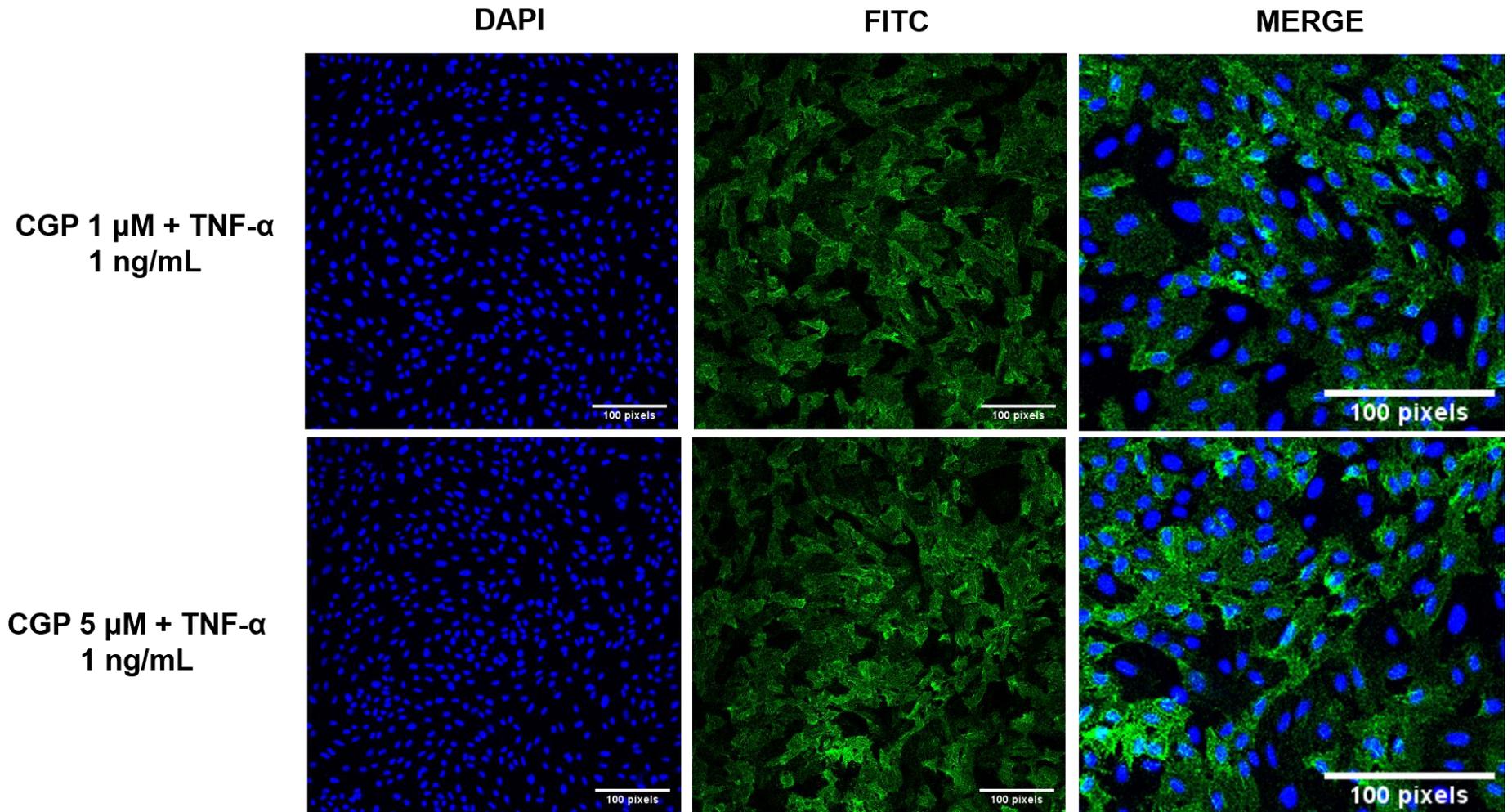
Células HUVEC foram tratadas por 1h com CGP nas concentrações de 1 a 200 μ M. Em seguida, as células foram estimuladas com TNF- α (1 ng/mL) por 4h. Após este período, foram marcadas *overnight* com anticorpo monoclonal para E-selectina (1:2000) e posteriormente levadas para análise no leitor de placas *IX Ultra Confocal Plate Reader*. As barras representam a intensidade média de fluorescência (MFI) em média \pm E.P.M e analisada por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. *** p <0,05 em relação ao controle mantido com meio DMEM. Foram realizados três experimentos independentes feitos em triplicatas.

FIGURA 17 – continuação.



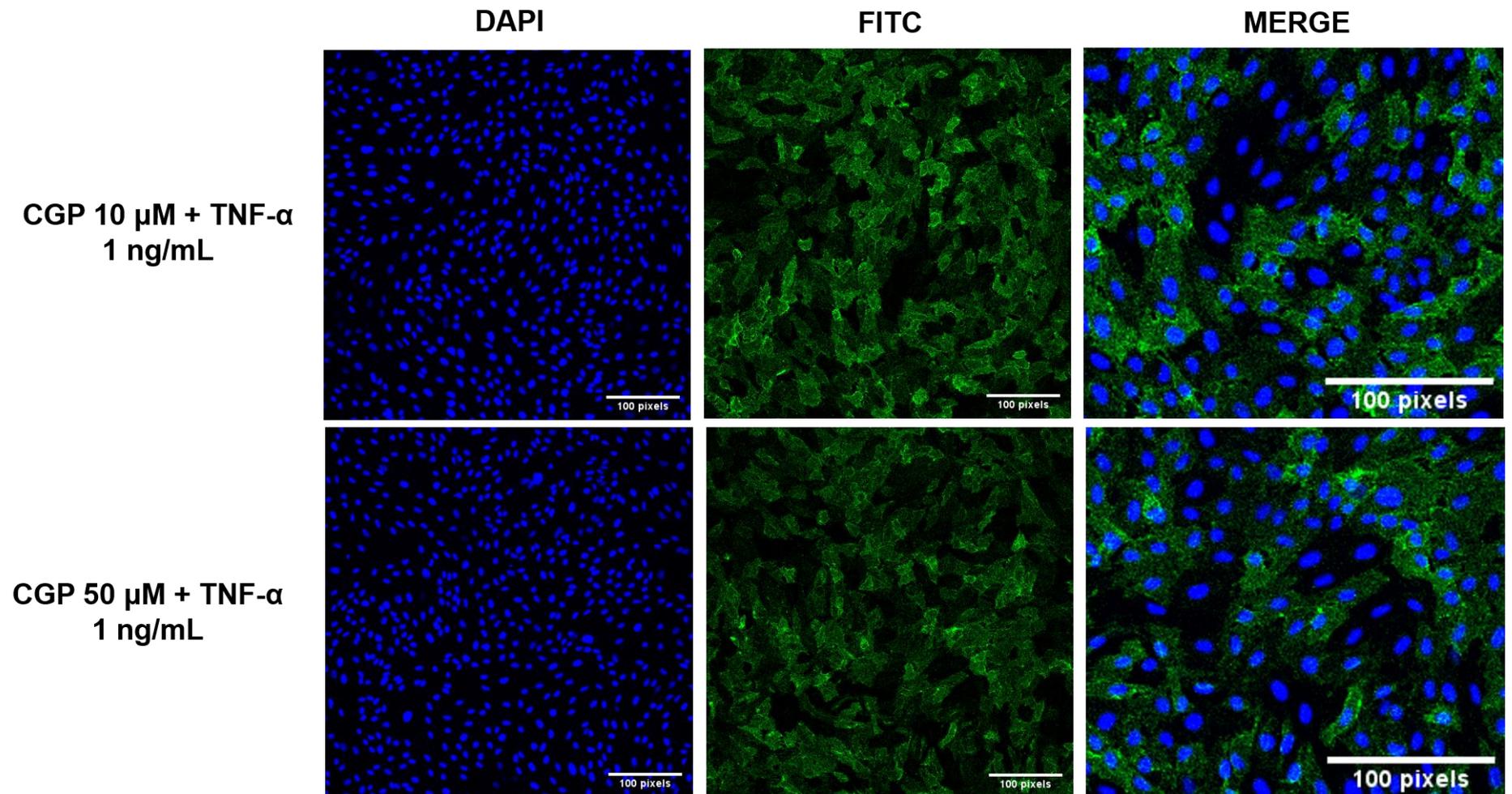
Marcação de imunofluorescência para E-selectina em células endoteliais. Células HUVEC foram tratadas por 1h com CGP nas concentrações de 1 a 200 μ M. Em seguida, as células foram estimuladas com TNF- α (1 ng/mL) por 4 h. Após este período, foram marcadas *overnight* com anticorpo monoclonal para E-selectina (1:2000) e posteriormente levadas para análise no leitor de placas IX Ultra Confocal Plate Reader. As fotos foram analisadas utilizando o MetaXpress 5.3 e a escala adicionada no ImageJ. (Aumento 10x).

FIGURA 17 – continuação.



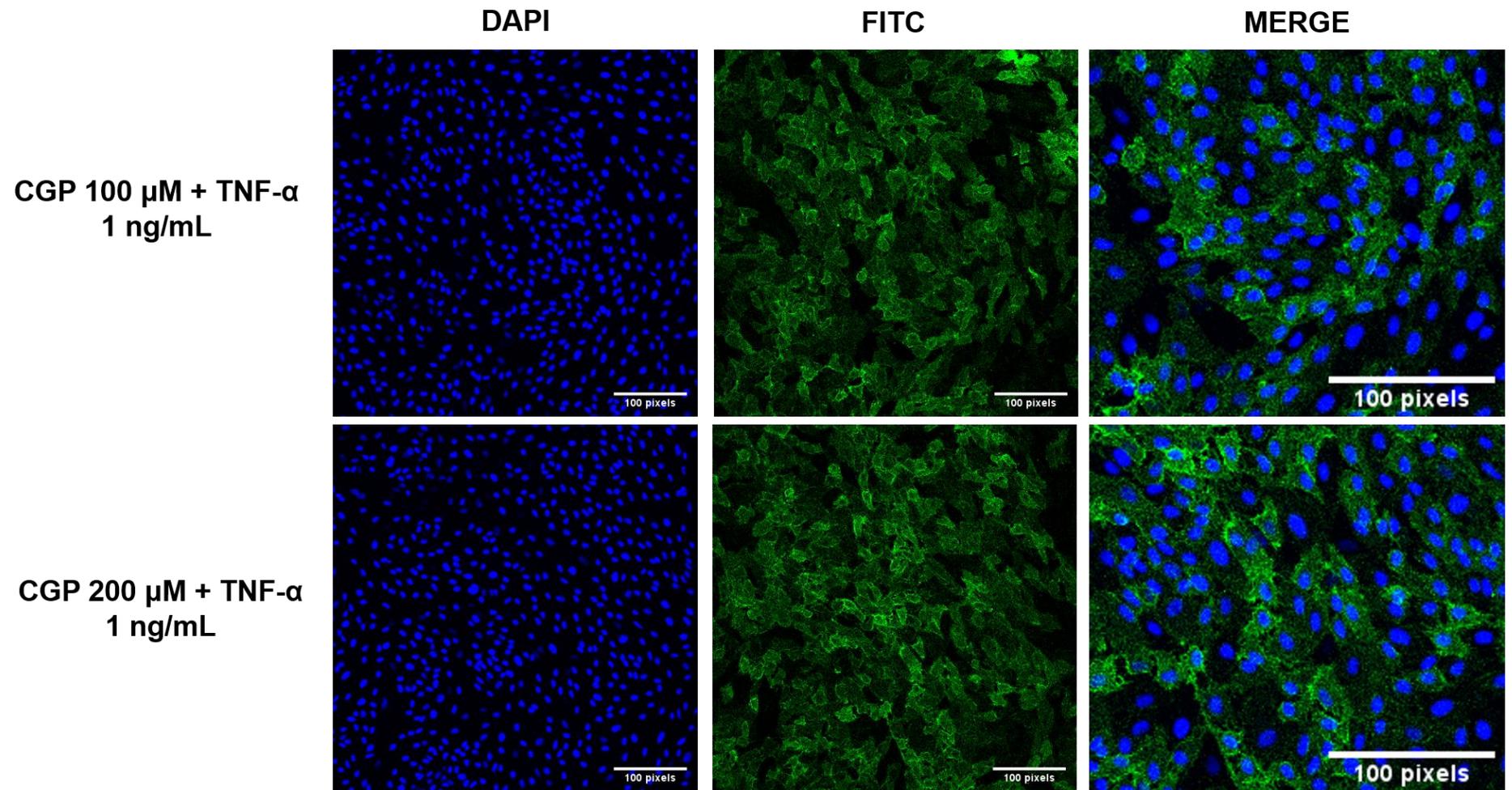
Marcação de imunofluorescência para E-selectina em células endoteliais. Neste painel observa-se as células HUVEC tratadas por 1 h com CGP nas concentrações de 1 e 5 μ M, e em seguida, estimuladas com TNF- α (1 ng/mL) por 4 h. As análises seguiram os procedimentos reportados anteriormente.

FIGURA 17 – continuação.



Marcação de imunofluorescência para E-selectina em células endoteliais. Neste painel observa-se as células HUVEC tratadas por 1 h com CGP nas concentrações de 1 e 5 μ M, e em seguida, estimuladas com TNF- α (1 ng/mL) por 4 h. As análises seguiram os procedimentos reportados anteriormente.

FIGURA 17 – continuação.

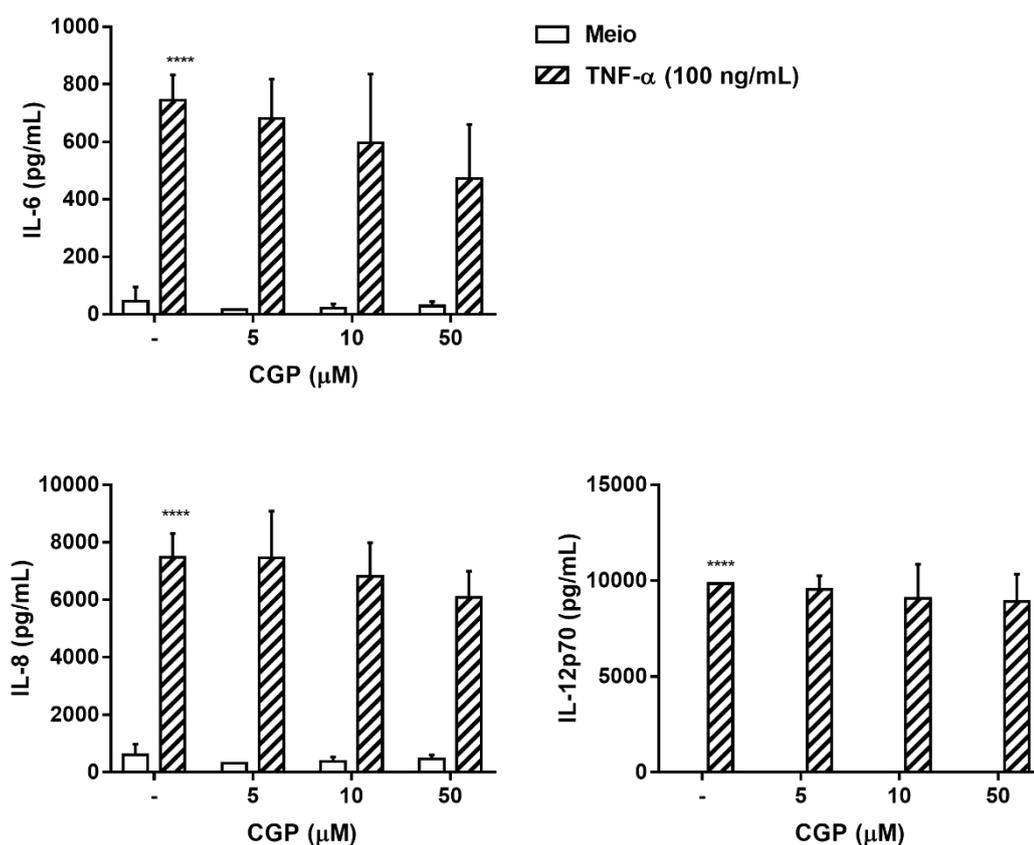


Marcação de imunofluorescência para E-selectina em células endoteliais. Neste painel observa-se as células HUVEC tratadas por 1 h com CGP nas concentrações de 1 e 5 μ M, e em seguida, estimuladas com TNF- α (1 ng/mL) por 4 h. As análises seguiram os procedimentos reportados anteriormente

5.5 – Efeito do CGP na produção de citocinas pró-inflamatórias

Com propósito de investigar se o tratamento com CGP seria capaz de interferir na ativação de células endoteliais, decidimos avaliar o efeito do tratamento com CGP na geração de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-6, IL-8 e IL-12p70 em células endoteliais estimuladas com TNF- α . Como esperado, as células endoteliais estimuladas com TNF- α apresentaram um aumento significativo na liberação de IL-6, IL-8 e IL-12p70 (FIGURA 18), fenômeno que não foi afetado de forma significativa pelo tratamento das células com o CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μ M (FIGURA 18).

FIGURA 18 – Produção de citocinas pro-inflamatórias em células endoteliais estimuladas.

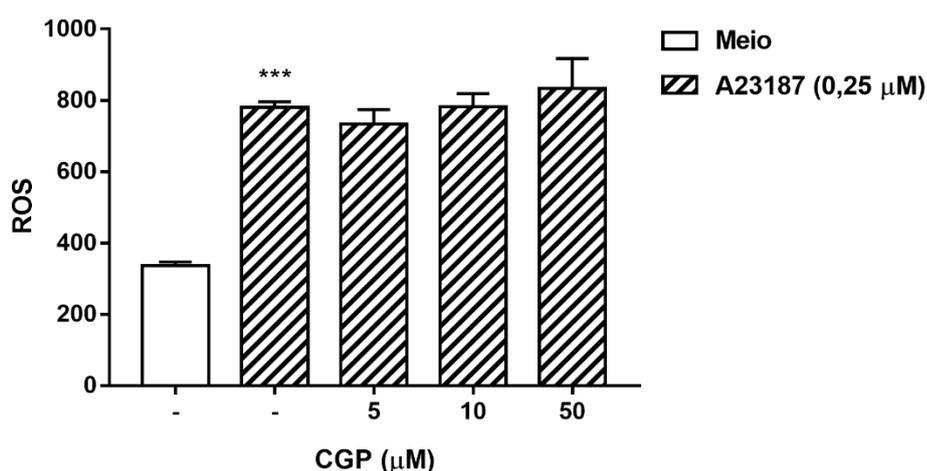


As células endoteliais foram tratadas com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μ M por 1h e em seguida foram estimuladas ou não com TNF- α (100 ng/mL). Após 24 h, o sobrenadante recolhido e utilizado para quantificar IL-6, IL-12-p70 e IL-8 pelo kit CBA (BD™) conforme descrito em Materiais e Métodos. Dados apresentados por média \pm E.P.M analisados por *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. **** $p \leq 0,001$ em relação as células mantidas com meio DMEM (controle). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.6 – Efeito do CGP na geração de espécies reativas de oxigênio

Estendendo nossas análises para avaliar o efeito do CGP sobre outro mediador pro-inflamatório, quantificamos a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células endoteliais tratadas com CGP e ativadas por ionóforo de cálcio (A23187). Como previsto, a estimulação de células endoteliais com ionóforo gerou aumento significativo no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (FIGURA 19). O tratamento com CGP em todas as concentrações testadas não alterou de forma significativa a quantidade destas espécies geradas pelo ionóforo (FIGURA 24).

FIGURA 19 – Ação do CGP sobre a geração de espécies reativas de oxigênio.

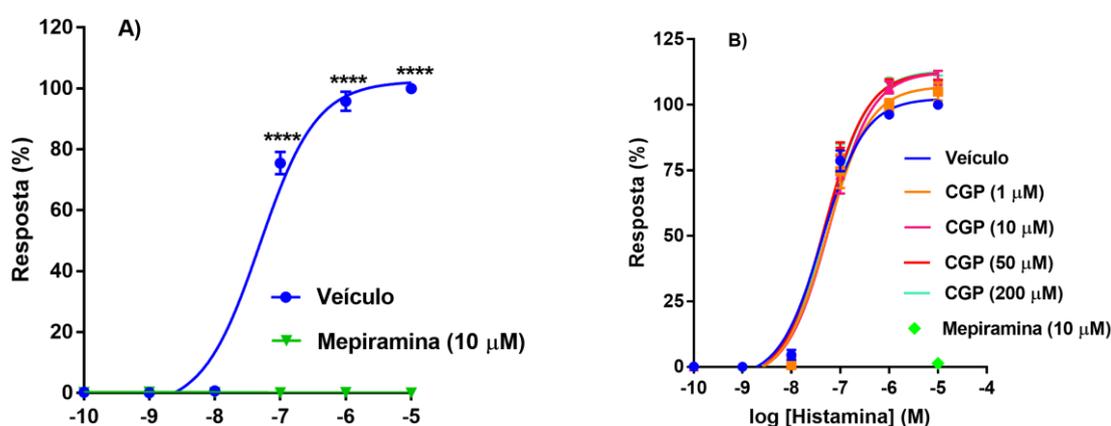


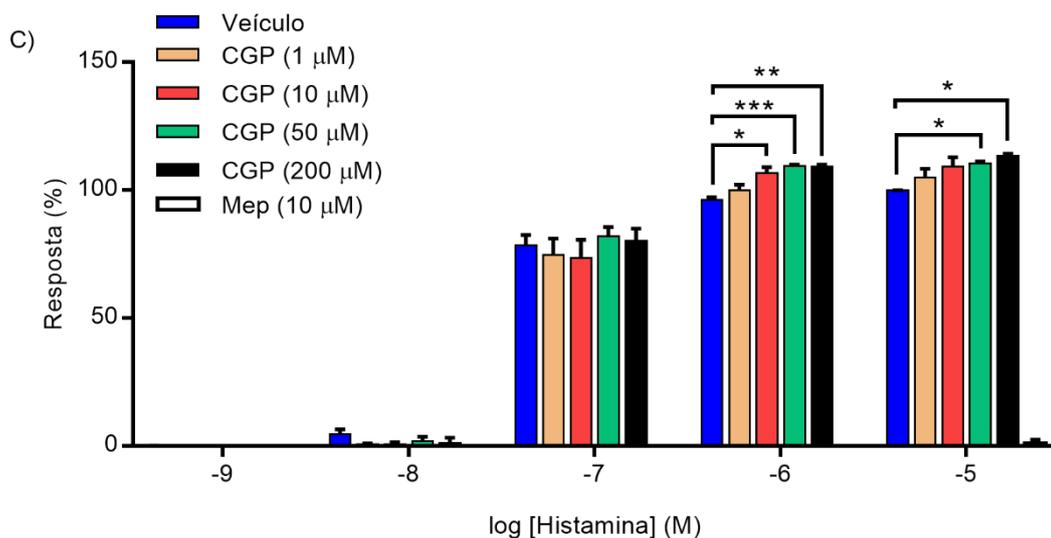
Células da linhagem endotelial EA.hy926 foram tratadas com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 µM por 1h seguido do estímulo com ionóforo de cálcio (A23187) 0,25 µM por 30 minutos. A quantificação das espécies reativas de oxigênio foi realizada através da sonda DCFH-DA (10 µM) e posterior análise da fluorescência por citometria de fluxo. As barras representam a intensidade de fluorescência como média ± E.P.M e analisada por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle da sonda DCFH-DA. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.7 - Mobilização de Cálcio

Devido à crucial participação do cálcio na ativação endotelial, foi avaliado o efeito do CGP na mobilização de cálcio intracelular em células HUVEC. O tratamento com histamina em concentrações acima de 10^{-7} M promoveu um aumento significativo na concentração de cálcio intracelular (FIGURA 20). O tratamento com CGP não foi capaz de afetar os níveis de cálcio nas células estimuladas. No entanto, o tratamento com o dipeptídeo nas concentrações acima de $10 \mu\text{M}$ resultou num aumento transiente na mobilização deste mensageiro celular nas células tratadas com histamina. No entanto, o CGP não foi capaz de induzir o aumento de cálcio *per se*, ou seja, sem a presença de histamina (FIGURA 20).

Figura 20 – Ação do CGP sobre os níveis de cálcio intracelular na presença de histamina.



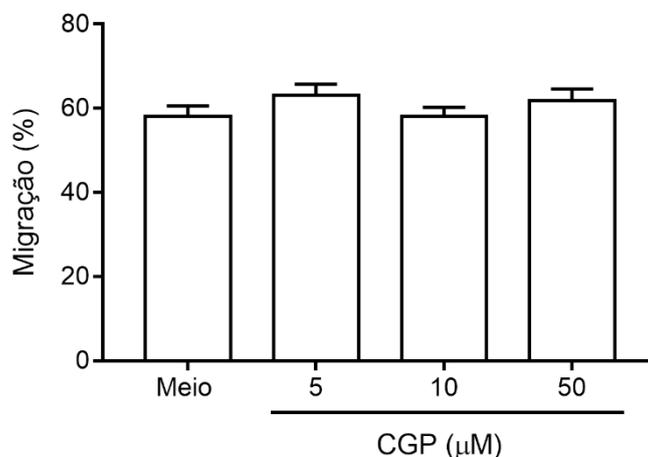


Células HUVEC foram tratadas por 45 minutos com veículo (probenecida, *brilliant black* e fluo-4) (A) ou CGP nas concentrações de 1, 10, 50 e 200 μM (B). Em seguida, as células foram colocadas no leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Decives, LLC). O equipamento foi programado para transferir histamina (10^{-10} a 10^{-5} M) ou CGP (1-200 μM). **A** - Porcentagem de resposta relativa aos níveis de cálcio intracelular apresentada por média \pm E.P.M e analisada por *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com o antagonista mepiramina (Mep, 10 μM). **B e C** - Porcentagem de resposta relativa aos níveis de cálcio intracelular apresentada por média \pm E.P.M e analisada por *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

5.8 – Efeito do CGP sobre a migração de células endoteliais

Como a migração celular é um evento chave em várias etapas da inflamação na qual o endotélio participa de forma direta e indireta, seguimos por avaliar o efeito do CGP na migração de células endoteliais. Como apresentado na Figura 21, o tratamento por 24 horas com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 μM não alterou o padrão migratório das células EA.hy926 em comparação as células mantidas apenas com meio do cultivo DMEM.

FIGURA 21 – Migração espontânea das células endoteliais.



As células endoteliais EA.hy926 foram semeadas em placas de 24 poços, e após 24 h foram tratadas com mitomicina (4 µg/mL) por 2h. Em seguida, foi realizado o risco (*gap*) e as células foram tratadas com CGP nas concentrações de 5, 10 e 50 µM. Foram retiradas fotomicrografias nos tempos de 0 h e 24 h após o tratamento. Dados apresentados por média ± E.P.M analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Foi realizado três experimentos independentes em triplicata.

Com a disponibilidade de acesso as células HUVEC, também avaliamos o comportamento migratório destas células estimuladas com VEGF frente ao tratamento com CGP. Conforme apresentado na Figura 22, células HUVEC tratadas com CGP nas concentrações de 1, 10, 50 e 200 µM não exibiram alterações significativas no padrão de migração quando estimuladas por VEGF (10 nM).

FIGURA 22 – Efeito do CGP sobre a migração de células HUVEC estimuladas com VEGF.

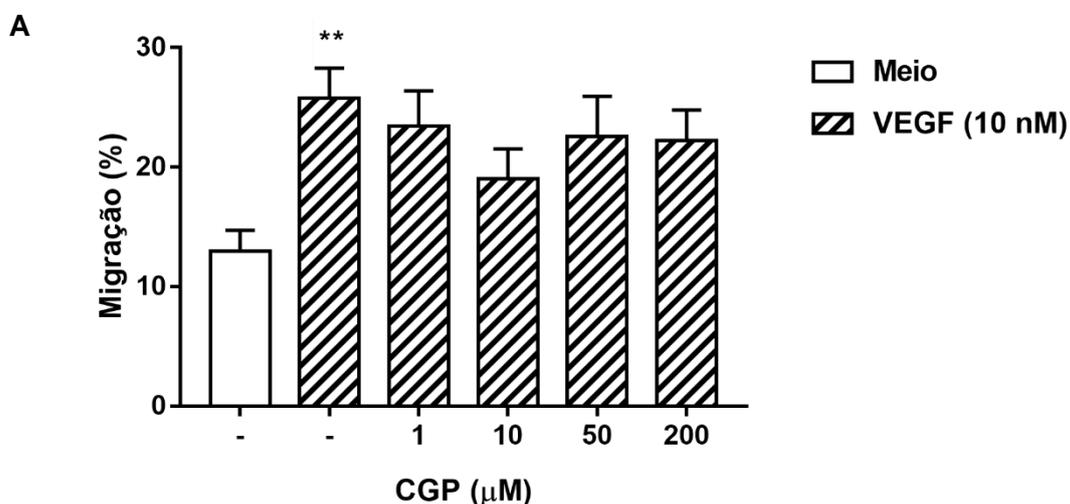
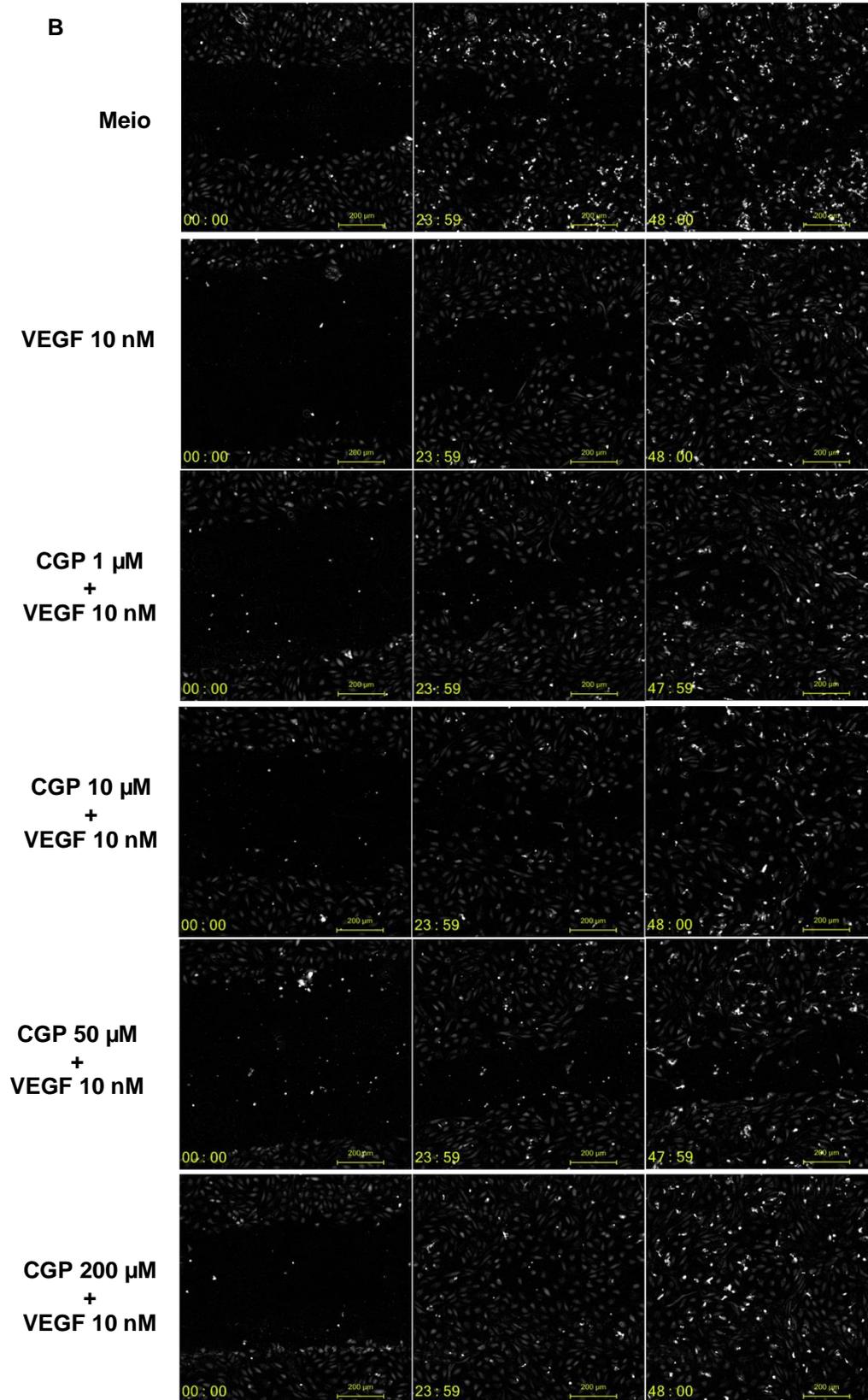


FIGURA 22 – continuação.



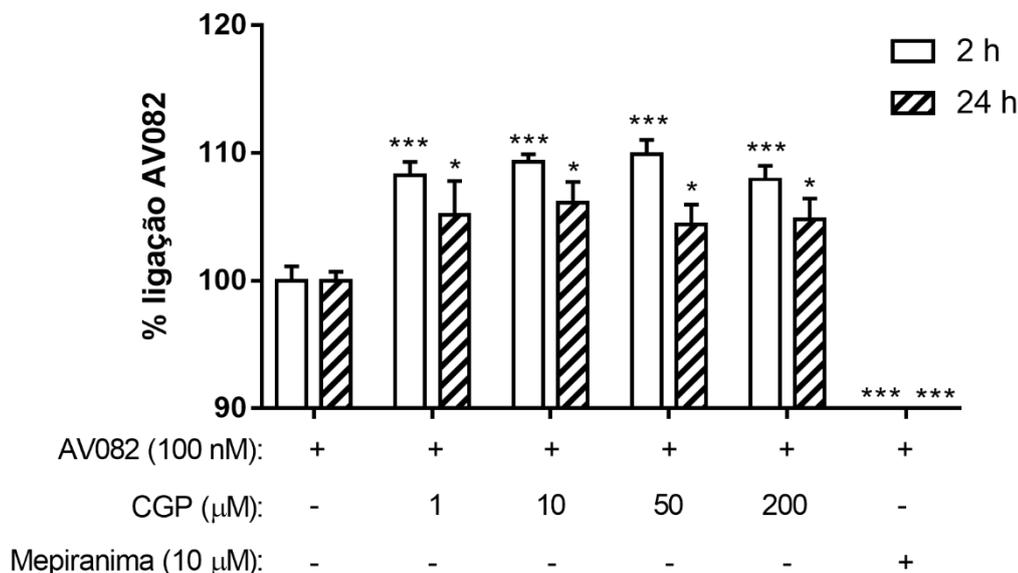
As células endoteliais HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços. No dia seguinte, foi realizado o risco (*gap*). Logo depois, as células foram tratadas com VEGF (10 nM) e CGP nas concentrações de 1 a 200 μ M. Em seguida, foram analisadas por 48 horas no LiveCyte™ Cell Imaging, Phasefocus. **A-**

Dados apresentados por média \pm E.P.M analisados por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Foram realizados 4 experimentos com n=1-3. **B** - Fotomicrografias da migração das células HUVEC. No dia seguinte, foi realizado o risco (*gap*). As imagens foram analisadas no Liveocyte™ Cell Imaging Phasefocus.

5.9 – Interação do CGP com sítios de ligação em receptores envolvidos com a resposta inflamatória

Nos resultados a seguir buscou-se identificar a interação do CGP com receptores que estão envolvidos em diferentes etapas da resposta inflamatória. Para isso, foi avaliada a afinidade de ligação do CGP a distintos receptores tendo como base a estratégia de competição com os ligantes naturais para os respectivos receptores. No ensaio de nanoBRET, a ligação do ligante ao seu receptor específico induziu um aumento significativo na luminescência indicando a elevada afinidade da interação receptor e ligante natural. Neste experimento, o antagonista, por impedir a interação do ligante natural é capaz de reduzir significativamente a luminescência. Como apresentado na Figura 23, o tratamento das células com AV082, o ligante natural do receptor H₁, induziu um aumento de cerca de 100% no sinal de luminescência. Quando as células foram expostas ao CGP foi observado um aumento em torno de 10% no sinal, sugerindo um incremento na interação entre o ligante natural e o seu receptor. Esse perfil de resposta manteve-se o mesmo quando se avaliou a interação ligante-receptor no tempo de 2 ou 24 h. O antagonista de receptor H₁, mepiramina, bloqueou o sinal de luminescência (FIGURA 23).

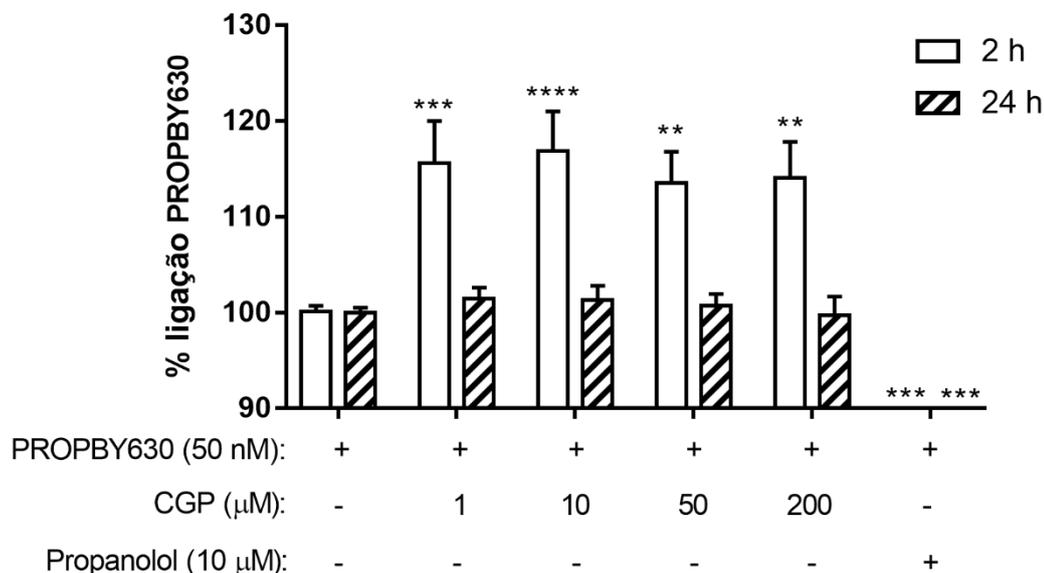
FIGURA 23 – Interação do CGP com receptores H1 em células humanas HEK293T.



Células epiteliais humanas da linhagem HEK293T foram transfectadas com os receptores H₁. As células em foram tratadas com CGP, e após 24 horas, foram expostas ao CGP ou ligante não-fluorescente e o seu ligante fluorescente (AV082). Após o tempo de 2 horas, foi adicionado o substrato furimazina (concentração final 10 mM) por 5 minutos. A luminescência emitida foi monitorada utilizando o leitor de microplacas *PERAstar FS*. O gráfico representa a porcentagem de ligação aos ligantes fluorescentes específicos apresentada por média ± E.P.M e analisada por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. ***p<0,001 e *p<0,01 em relação ao controle com apenas o ligante fluorescente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Conforme observado na Figura 24, o tratamento das células com PROPBAY630, o ligante natural do receptor β₂, resultou em um aumento 100% no sinal de fluorescência. O tratamento das células com CGP, em todas as concentrações testadas, proporcionou um aumento de cerca de 15% no sinal de fluorescência após 2 h, sugerindo um incremento na interação entre o ligante natural e o seu receptor. Esse perfil de resposta não foi observado após 24 h do tratamento com o ligante fluorescente. O antagonista de receptor β₂, propanolol, bloqueou o sinal de fluorescência (FIGURA 24).

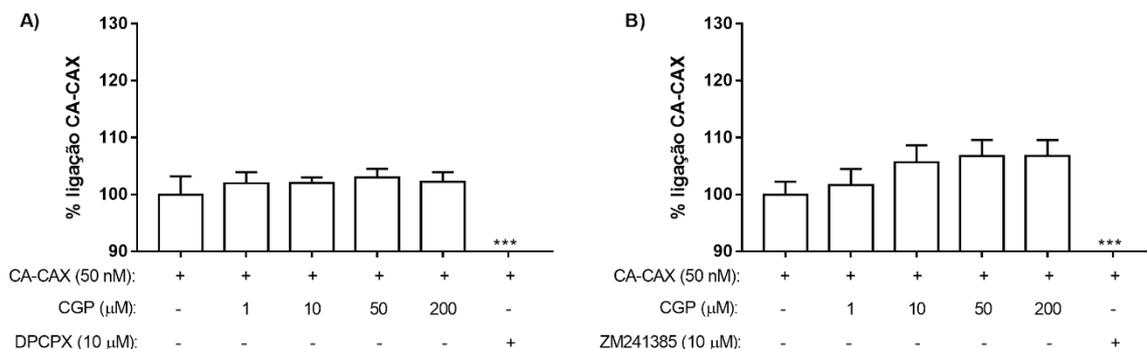
FIGURA 24 – Interação do CGP com os receptores β_2 em células humanas HEK293T.



Células epiteliais humanas da linhagem HEK293T foram transfectadas com os receptores β_2 . As células tratadas com CGP, e após 24 horas, foram expostas ao CGP ou ao ligante não-fluorescente, propranolol, e o seu respectivo ligante fluorescente por 2 ou 24 horas. Após o tempo decorrido, foi adicionado o substrato furimazina (concentração final 10 mM) por 5 minutos. A luminescência emitida foi monitorada utilizando o leitor de microplacas *PERAstar FS*. As barras representam a porcentagem de ligação aos ligantes fluorescentes específicos apresentada por média \pm E.P.M e analisada por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. *** p < 0,05 em relação ao controle com apenas o ligante fluorescente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Na Figura 25, pode ser observado que o tratamento das células com os ligantes naturais para receptores de adenosina, A_1 e A_{2A} , resultou em um aumento de cerca de 100% no sinal de luminescência. Na Figura 25A, o tratamento das células com CGP, em todas as concentrações testadas, não afetou alterou o sinal de luminescência após 2 h, sugerindo não haver influência sobre a interação entre o ligante natural e os receptores A_1 . Na Figura 25B, a exposição das células ao CGP, apesar de um incremento no sinal de luminescência nas maiores concentrações, também não afetou de forma significativa a interação entre o ligante natural e os receptores A_{2A} após 2 h. O antagonista de receptor A_1 e A_{2A} , DPCPX e ZM241385, bloquearam o sinal de luminescência (FIGURA 25A-B).

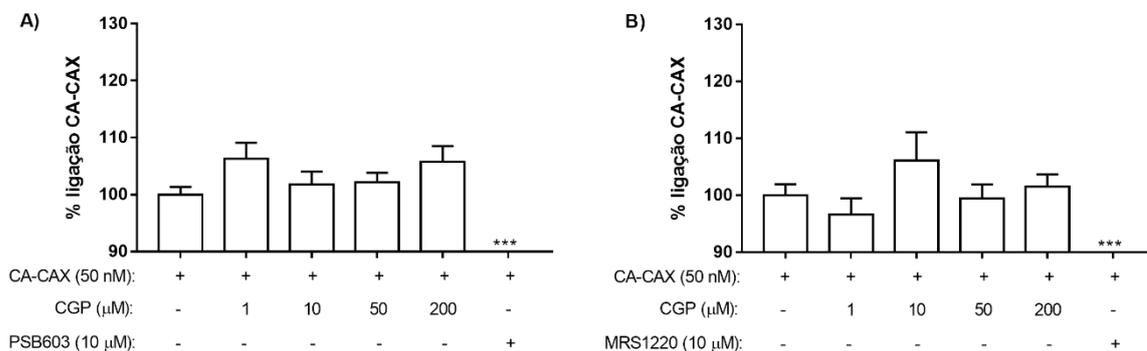
FIGURA 25 – Interação do CGP com receptores A₁ e A_{2A} em células humanas HEK293T.



Células epiteliais humanas da linhagem HEK293T foram transfectadas com os receptores para adenosina A₁ e A_{2A}, respectivamente. Em seguida, as células foram tratadas com CGP ou com respectivo ligante não-fluorescente e ligante fluorescente. Após 2 horas, foi adicionado o substrato furimazina (concentração final 10 mM) por 5 minutos. A luminescência emitida foi monitorada utilizando o leitor de microplacas PHERAstar FS. As barras representam a porcentagem de ligação aos ligantes fluorescentes específicos apresentada por média ± E.P.M e analisada por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. ***p<0,001 em relação ao controle com apenas o ligante fluorescente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Na Figura 26, pode ser observado que o tratamento das células com os ligantes naturais para receptores de adenosina, A_{2B} e A₃, resultou em um aumento de cerca de 100% no sinal de luminescência. Na Figura 26A, o tratamento das células com CGP, em todas as concentrações testadas, não alterou o sinal de luminescência após 2 h, sugerindo não haver influência sobre a interação entre o ligante natural e os receptores A_{2B}. Na Figura 26B, a exposição das células ao CGP, apesar de um incremento no sinal de luminescência nas maiores concentrações, também não afetou de forma significativa a interação entre o ligante natural e os receptores A₃ após 2 h. O antagonista de receptor A₁ e A_{2A}, PSB603 e MRS1220, bloquearam o sinal de luminescência (FIGURA 26 A-B).

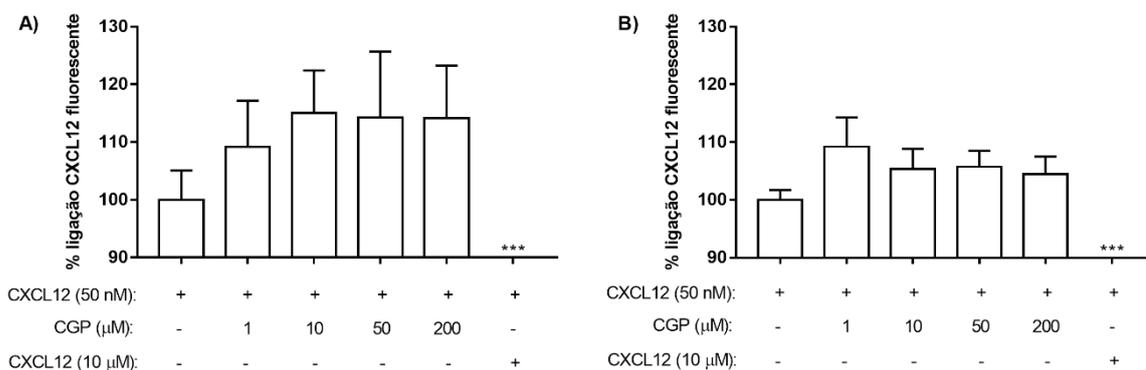
FIGURA 26 – Interação do CGP com receptores A_{2B} e A₃ em células humanas HEK293T.



Células epiteliais humanas da linhagem HEK293T foram transfectadas com os receptores de adenosina A_{2B} e A₃, respectivamente. Em seguida, foram tratadas com CGP ou com respectivo ligante não-fluorescente e ligante fluorescente. Após 2 horas, foi adicionado o substrato furimazina (concentração final 10 mM) por 5 minutos. A luminescência emitida foi monitorada utilizando o leitor de microplacas *PHERASstar FS*. As barras representam a porcentagem de ligação aos ligantes fluorescentes específicos apresentada por média ± E.P.M e analisada por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. ***p<0,001 em relação ao controle com apenas o ligante fluorescente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Na Figura 27, pode ser observado que o tratamento das células com os ligantes naturais para receptores CXCR4 e CXCR7, resultou em um aumento de cerca de 100% no sinal de luminescência. Na Figura 27A, o tratamento das células com CGP, em todas as concentrações testadas, apesar de um aparente aumento, não foi capaz de afetar de forma significativa a luminescência após 2 h, sugerindo não haver influência sobre a interação entre o ligante natural e os receptores CXCR4. Na Figura 26B, a exposição das células ao CGP também não afetou de forma significativa a interação entre o ligante natural e os receptores CXCR7 após 2 h. O ligante natural para os receptores CXCR4 e CXCR7, CXCL12, bloqueou o sinal de luminescência (FIGURA 27A-B).

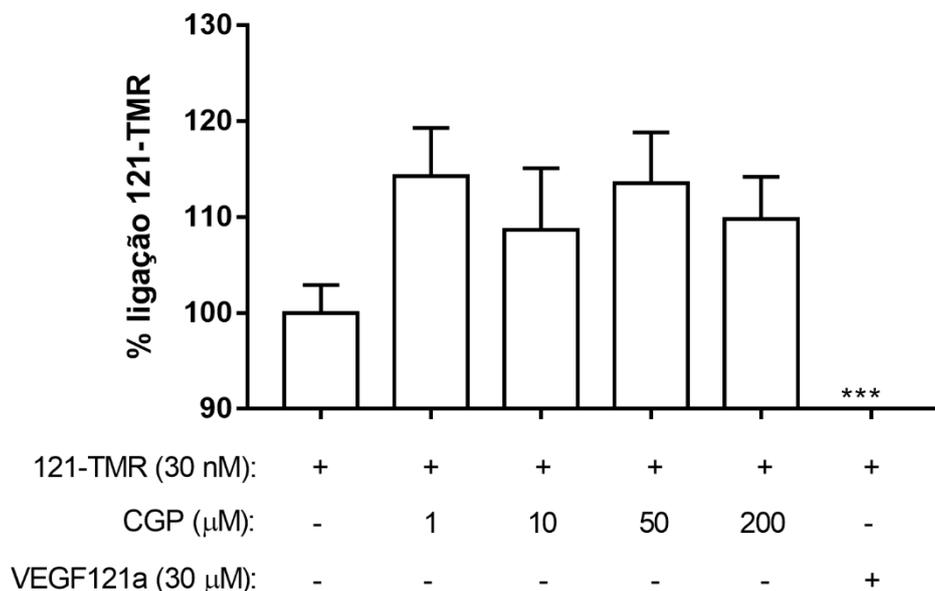
FIGURA 27 – Interação do CGP com receptores CXCR4 e CXCR7 em células humanas HEK293T.



Células epiteliais humanas da linhagem HEK293T foram transfectadas com os receptores CXCR4 e CXCR7, respectivamente. Em seguida, foram tratadas com CGP ou ligante natural não fluorescente (CXCL12) e o seu respectivo ligante fluorescente. Após 2 horas, foi adicionado o substrato furimazina (concentração final 10 mM) por 5 minutos. A luminescência emitida foi monitorada utilizando o leitor de microplacas *PHERASTAR FS*. As barras representam a porcentagem de ligação aos ligantes fluorescentes específicos apresentada por média \pm E.P.M e analisada por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com apenas o ligante fluorescente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Conforme observado na Figura 28, o tratamento das células com VEGF, o ligante natural do receptor VEGFR2, resultou em um aumento 100% no sinal de luminescência. O tratamento das células com CGP, em todas as concentrações testadas, proporcionou um aumento no sinal de luminescência após 2 h, sugerindo um incremento na interação entre o ligante natural e o seu receptor. O antagonista de receptor VEGF_{121a} bloqueou o sinal de luminescência (FIGURA 28).

FIGURA 28 – Interação do CGP com receptores VEGFR2 em células humanas HEK293T.



Células epiteliais humanas da linhagem HEK293T foram transfectadas com receptores VEGFR2. Em seguida, foram tratadas com CGP ou ligante não-fluorescente (VEGF121a) e o seu respectivo ligante fluorescente. Após 2 horas, foi adicionado o substrato furimazina (concentração final 10 mM) por 5 minutos. A luminescência emitida foi monitorada utilizando o leitor de microplacas *PHERASTAR FS*. As barras representam a porcentagem de ligação aos ligantes fluorescentes específicos apresentada por média \pm E.P.M e analisada por *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ em relação ao controle com apenas o ligante fluorescente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

6 – DISCUSSÃO

No presente estudo, nós avançamos na avaliação *in vitro* dos efeitos do CGP, um dipeptídeo cíclico formado por glicina e prolina, o ciclo(Gli-Pro), sobre importantes eventos da resposta inflamatória, em especial sobre função de células endoteliais. Inicialmente, ao se avaliar a adesão entre neutrófilos-endotélio, constatamos que o endotélio tratado com CGP impede a adesão de neutrófilos à sua superfície. Ao ser avaliada a participação das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina, constatamos que o CGP não alterou o perfil de expressão destas moléculas. Além disso, a capacidade de secreção de citocinas IL-6, IL-8 e IL-12-70, de produção de ROS, ou mesmo o influxo de cálcio intracelular, também não foram afetados pelo tratamento com CGP. Entretanto, o CGP proporcionou uma maior interação dos receptores H₁ e β₂ com seus agonistas, mas não interferiu com a dinâmica de interação dos receptores A1, A2A, A2B, A3, VEGFR2, CXCR4 e CXCR7.

De fato, os peptídeos cíclicos tem se mostrado portadores de grande sucesso na terapêutica. Distintos fármacos desta natureza são amplamente aplicados na prática clínica, tais como os análogos do hormônio oxitocina, a octreotida e a vasopressina, os antibióticos vancomicina, daptomicina e polimixina B, e o fármaco imunossupressor ciclosporina (ZORZI; DEYLE; HEINIS, 2017). O sucesso deste dos peptídeos cíclicos na terapêutica de distintas patologias pode ser atribuído a várias propriedades favoráveis, incluindo: i) alta afinidade e seletividade para os alvos proteicos; ii) pouca ou nenhuma toxicidade; iii) facilidade de síntese química automatizada, sendo ainda estruturas simples de modificar, manipular e caracterizar (JING; JIN, 2020).

Os dipeptídeos cíclicos são amplamente encontrados na natureza, sendo uma classe de moléculas composta por dois aminoácidos unidos na conformação cíclica, que exibem ainda um amplo espectro de atividades farmacológicas. Por exemplo, o ciclo(Fenilalanina-Prolina) e ciclo(Fenilalanina-Prolina) exibem propriedades antifúngicas. A eritrocelina e ácido dimerumico são sideróforos, enquanto o roquefortine C e a acetilaszonalenina são micotoxinas. Biciclomicin e albonoursin são agentes antibacterianos, e thaxtomin A atua como uma fitotoxina. A brevianamida S exibe atividade antibacteriana seletiva contra o *Mycobacterium bovis*.

Ambewelamidas A e B, fenilhistina e verticilina A exibem propriedades antitumorais. A gliotoxina e a sirodesmina antivirais e imunossupressoras (MISHRA *et al.*, 2017).

Contribuindo para caracterização das atividades farmacológicas dos dipeptídeos cíclicos, nosso grupo demonstrou que este o dipeptídeo ciclo(Gli-Pro) (CGP) possui relevante atividade anti-inflamatória *in vivo*, por suprimir a formação do edema inflamatório e reduzir o infiltrado de neutrófilos no tecido (FERRO *et al.*, 2015), fenômenos que podem estar associados as funções das células endoteliais no contexto da resposta inflamatória.

O processo de migração de leucócitos através do endotélio é essencial para a chegada destas células ao sítio inflamatório. O endotélio ativado aumenta a expressão de moléculas adesivas em sua membrana, permitindo a adesão dos leucócitos e facilitando sua migração através da monocamada endotelial. Em camundongos, o CGP foi capaz de diminuir a chegada de neutrófilos ao sítio inflamatório (FERRO *et al.*, 2015), fato que pode estar associado à diminuição da liberação de quimiocinas inflamatórias como IL-8, assim como à uma menor adesão de neutrófilos às células endoteliais. Para mimetizar a interação entre o endotélio e o neutrófilo, demonstramos que a linhagem endotelial EA.hy 926 tratada com CGP não têm sua capacidade de liberar IL-8 afetada, no entanto, a adesão dos neutrófilos a este endotélio foi fortemente comprometida. Cabe destacar também que o CGP não se mostrou citotóxico, resultado que está em sintonia com estudos prévios da literatura (BRAUNS *et al.*, 2004). Em concordância com o efeito apresentado pelo CGP, os dipeptídeos cíclicos ciclo(Prolina-Valina), ciclo(Prolina-Tirosina) e ciclo(Prolina-Leucina) foram capazes de atenuar de forma dependente de dose a adesão de neutrófilos humanos estimulada por LPS (lipopolissacarídeo) à células endoteliais HUVEC (KANG *et al.*, 2016). Logo, é possível sugerir que o CGP possa estar agindo de forma similar a estes dipeptídeos, entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para melhor caracterizar este aspecto.

De maneira alternativa, foi previamente demonstrado que a endomucina, uma glicoproteína expressa na superfície de células endoteliais, mostra-se capaz de reduzir a adesão de neutrófilos por impedir a interação entre os receptores LFA-1 (nos neutrófilos) e ICAM-1 (nas células endoteliais) (ZHR *et al.*, 2016). Logo, mesmo de forma especulativa, não se pode descartar que o CGP possa estar aumentando a expressão de endomucina na superfície membranar de células endoteliais, e com isso

reduzindo a interação LFA-1/ICAM-1 e impedindo a adesão neutrófilo-endotélio. Porém, uma avaliação da expressão de endomucina nas células endoteliais tratadas com CGP se faz necessária.

Considerando que a interação entre endotélio-leucócitos é um evento determinante para a transmigração dos neutrófilos para o tecido, e que este evento é orquestrado pela ação combinada de receptores de adesão celular e fatores quimiotáticos (ZHANG, 2008), decidimos avaliar o efeito do CGP sobre a expressão de moléculas de adesão na célula endotelial. Nossos resultados revelaram que o CGP não inibiu a expressão de ICAM-1 em células EA.hy 926, ou mesmo, a expressão de E-selectina em células HUVEC, indicando que o efeito do CGP em inibir a adesão de neutrófilos ao endotélio não decorre de uma menor expressão destas moléculas de adesão nas células endoteliais. A expectativa que se tinha do efeito do CGP em induzir uma redução na expressão destas moléculas de adesão, teve como base trabalhos prévios que demonstraram a capacidade dos dipeptídeos ciclo(Prolina-Valina), ciclo(Prolina-Tirosina) e o ciclo(Prolina-Leucina) em inibir a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células HUVEC (JUNG *et al.*, 2016). Porém, apesar destes dipeptídeos possuírem prolina na sua constituição, a presença da glicina na estrutura da molécula pode interferir nos alvos moleculares de ligação do CGP, ocasionando respostas biológicas diferentes. Neste aspecto, estudos com abordagens bioquímicas devem ser realizados para melhor esclarecer este aspecto.

É bem conhecido o papel das citocinas e quimiocinas nas etapas de ativação de células endoteliais e mobilização de leucócitos para o tecido inflamado (GATLA *et al.*, 2019). A partir deste conhecimento, e sabendo da importância de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-6, IL-8, IL-12p70 e ROS, para a interação endotélio-leucócito (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019) avaliamos os efeitos do CGP na produção destes mediadores por células endoteliais. Nossos resultados revelaram que o CGP não foi capaz de interferir de forma significativa com a secreção de nenhum destes mediadores pró-inflamatórios. Vale a pena mencionar que estes mediadores pró-inflamatórios avaliados não são os únicos a induz resposta biológica em células endoteliais que interferem na interação endotélio-leucócito, abrindo, portanto, uma vasta opção para identificar outros possíveis alvos de ação do CGP.

Na busca por sistemas intracelulares capazes de atuar como reguladores da função celular, o íon cálcio (Ca^{2+}) mostra-se como um segundo mensageiro

onipresente que contribui para governar uma ampla variedade de processos celulares (FILIPPINI; D'AMORE; D'ALESSIO, 2019). A sinalização do Ca^{2+} no endotélio é responsável por muitas funções vasculares, variando desde o controle do tônus vascular pela produção de fatores vasoativos, secreção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de adesão, e angiogênese (DALAL; MULLER; SULLIVAN, 2020). Sendo assim, considerando a diversidade de funções do cálcio nas células endoteliais, decidimos avaliar o efeito do CGP no influxo de Ca^{2+} . Nossos resultados revelaram que o CGP incrementou o influxo de Ca^{2+} induzido histamina em células endoteliais, sem, no entanto, afetar os níveis de cálcio *per se* nas células. Dentre a vasta gama de agonistas capazes de induzir a mobilização intracelular de Ca^{2+} , a histamina através do receptor H_1 e da via VEGF/VEGFR2 desempenha um papel fisiológico relevante na função endotelial (ESPOSITO *et al.*, 2011; FAVIA *et al.*, 2014). Vale mencionar ainda que os dipeptídeos cíclicos são também descritos por sua capacidade de aumentar a atividade biológica de agonistas. Tal propriedade foi descrita por Mohammed e colaboradores (2016) que demonstraram os efeitos do dipeptideo ciclo(Fenilalanina-Naftalenilalanina) em incrementar os efeitos do diclofenaco (MOHAMMED *et al.*, 2016). Portanto, é possível sugerir que o CGP possa ter seus efeitos por estar interagindo diretamente com os receptores da histamina no endotélio, o que poderia justificar um aumento na mobilização de Ca^{2+} nas células endoteliais.

Vários estudos já demonstraram que mudanças nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático são importantes para a migração de células endoteliais (DALAL; MULLER; SULLIVAN, 2020). Sabe-se, por exemplo, que um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} é necessário para iniciar o movimento após estímulo direto sobre uma monocamada de células endoteliais *in vitro* (TRAN *et al.*, 1999). Portanto, com base na importância das variações nos níveis intracelulares deste segundo mensageiro sobre a resposta migratória celular, decidimos avaliar se o CGP teria efeito direto na motilidade de células endoteliais. Nossos resultados revelaram que o CGP não interferiu no padrão de motilidade celular avaliado pelo ensaio de migração horizontal (*scratch assay*), apesar de estudos prévios já terem demonstrado que outros dipeptídeos cíclicos, como ciclo(Leu-Pro), sejam capazes de interferir na migração de células (GOWRISHANKAR *et al.*, 2016). Vale a pena mencionar que os resultados do presente estudo foram obtidos utilizando o ensaio de migração

horizontal, talvez, em outro sistema experimental onde se possa mensurar a resposta invasiva das células, como por exemplo no modelo de migração *transwell*, o CGP possa apresentar efeitos moduladores sobre a resposta migratória sobre as células endoteliais.

Os peptídeos cíclicos, devido as suas características estruturais como carga e tamanho, exibem uma significativa afinidade por alvos proteicos celulares, mesmo contra alvos para qual ainda não foram descritos sítios de ligação ou mesmo não possuem ligantes naturais (DOUGHERTY; SAHNI; PEI, 2019). Para avaliar a possível capacidade de interação do CGP com receptores expressos em células endoteliais envolvidas com a resposta inflamatória, foram realizados uma série de experimentos de transferência de energia de ressonância bioluminescente (NanoBRET). Neste conjunto de ensaios foi verificado a capacidade do CGP em interagir diretamente com receptores específicos expressos em células endoteliais, verificando sua capacidade de interferir diretamente com o agonista natural do receptor. Considerando as ações do CGP na mobilização de cálcio induzido por histamina, decidimos avaliar inicialmente o efeito do CGP na interação com receptores H₁. Nossos resultados revelaram que o CGP incrementou a interação do agonista com o seu receptor H₁. Este resultado mostra-se particularmente relevante, pois revela uma possível hipótese para ação supressora do CGP sobre o endotélio, uma vez que foi reportado anteriormente a capacidade de receptores H₁ suprimir a função endotelial (ADDERLEY; ZHANG; BRESLIN, 2015). Tal função do CGP sobre o receptor H₁ pode ser decorrente de uma ação direta sobre a estrutura conformacional do receptor levando a uma alteração da afinidade com seu agonista. De forma alternativa, é possível também especular que o CGP possa também atuar de forma indireta nas células endoteliais afetando sítios alostéricos e em conjunto com o ligante, alterando a conformação do receptor e conseqüentemente sua atividade biológica, e desta forma resultando na modulação da resposta celular. Cabe ainda registrar que o uso de antagonistas de receptor para histamina, cimetidina, foi reportado como inibidor da adesão entre o endotélio e células tumorais (KOBAYASHI *et al.*; 2000).

Com propósito de avaliar se o CGP teria também efeitos sobre outros receptores, avaliamos a interação deste dipeptídeo sobre os receptores β_2 . É amplamente conhecido que a ativação de receptores β_2 resulta em efeito anti-inflamatório em diferentes células, incluindo mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e

epitélio (HANANIA *et al.*, 2004). De forma semelhante ao observado com receptores H₁, o CGP também aumentou a interação do ligante ao receptor β₂, o que pode levar a um incremento na resposta intracelular deflagrada por este receptor. Prévios estudos demonstraram que a ativação do receptor β₂ mostra-se capaz de reduzir a fosforilação do NFκB e do IκBα em células endoteliais (SAFI *et al.*, 2018). De modo idêntico ao observado com os receptores H₁, podemos sugerir que o CGP possa estar interagindo de forma direta ou indireta com os receptores β₂ aumentando sua eficiência na interação com seu agonista, e conseqüentemente modulando a função endotelial.

A sinalização mediada por receptores de adenosina é amplamente reconhecida por atuar no processo inflamatório (LIU *et al.*, 2017). Estes receptores apresentam quatro distintos subtipos, denominados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, que influenciam a função celular dependente da sinalização associada à proteína G (BLACKBURN *et al.*, 2009). Estudos prévios reportam que os receptores de adenosina são capazes de regular a inflamação por distintas vias, seja por diminuir a adesão do neutrófilo ao endotélio, ou ainda por reduzir a produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão (HASKÓ; CRONSTEIN, 2013). No presente estudo o CGP não afetou a ligação dos agonistas específicos para cada um dos quatro subtipos de receptor, sugerindo que seus efeitos possivelmente não estão relacionados à uma interação com o receptor, entretanto este dipeptídeo pode ter um possível efeito na sinalização intracelular decorrente de sua ativação.

Um perfil idêntico ao observado com os receptores de adenosina foi visto com os receptores CXCR4 e CXCR7. A ativação dos receptores CXCR4 mostra-se relacionado a fenômenos inflamatórios importantes observados em patologias como na artrite reumatoide, aterosclerose e câncer (KIRCHER *et al.*, 2018). Já os receptores CXCR7 mostram-se importantes tanto para o estabelecimento quanto para a cronicidade da inflamação pulmonar (CHRISTOS-NGAMSRI *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstraram que o CGP não foi capaz de afetar a sinalização deflagrada por receptores CXCR4 e CXCR7, descartando estas proteínas como possíveis alvos moleculares de interação na célula.

O VEGF é o mediador central na angiogênese por promover a ativação e migração de células endoteliais *in vitro* (LAI; ADAMS, 2005) e angiogênese *in vivo* (ADINI *et al.*, 2017). Estes eventos deflagrados pelo VEGF são diretamente

dependentes da mobilização de Ca^{2+} nas células endoteliais (FAEHLING *et al.*, 2002). Ao verificar a possível interação do CGP com os receptores de VEGF, constatamos que o CGP não foi capaz de interferir com a sinalização desencadeada por este receptor. Apesar de dados prévios da literatura revelarem que peptídeos cíclicos podem diminuir a migração de células endoteliais *in vitro* por interferir com VEGFR, como o MCoTI-II (*Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor-II) (CHAN; CRAIK; DALY, 2016), nossos resultados revelaram que o VEGF também não se mostra como um possível alvo para interação deste dipeptídeo.

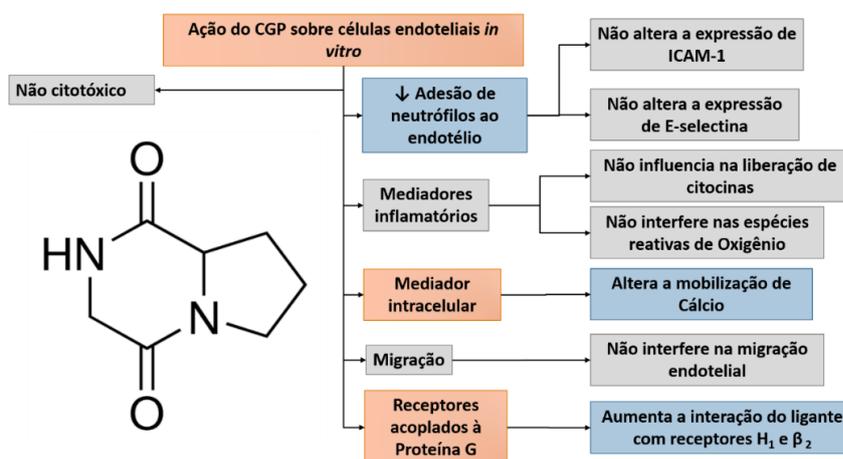
Vale ainda mencionar que outros alvos proteicos nas células endoteliais podem ainda ser identificados como possíveis locais de ligação do CGP, tais como as proteínas de junção celular relacionadas com a manutenção da barreira endotelial, incluindo as proteínas claudinas, ocludina, JAMs (*junctional adhesion molecules*) e ESAMs (*endothelial cell selective adhesion molecule*).

7 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o CGP reduziu a adesão direta neutrófilos ao endotélio. Tal efeito não interferiu com a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, IL-8 e IL-12-p70 e espécies reativas de oxigênio. Além disso, a menor adesão entre neutrófilo-endotélio não decorreu dos efeitos do CGP sobre a expressão de ICAM-1 e E-selectina em células endoteliais, assim como não alterou a migração destas células. De forma interessante, o CGP induziu um aumento no influxo de Ca^{2+} em células endoteliais estimuladas com histamina, fenômeno que pode ser relacionado a potencial do CGP em interagir com os receptores H_1 . Adicionalmente, o CGP também mostrou potencial para interferir com a sinalização de receptores β_2 , mas não com a sinalização dos receptores de adenosina (A_1 , A_2A , A_2B e A_3), quimiocinas (CXCR4 e CXCR7) e VEGF. Tomados em conjunto, demonstramos pela primeira vez que o CGP pode estar alterando a interação do ligante natural com os receptores H_1 e β_2 e que este efeito pode estar associado aos efeitos deste dipeptídeo sobre o endotélio.

Como perspectiva, além de utilizar o *docking* como ferramenta para melhor esclarecer a possível interação do CGP com o complexo ligante-receptor, buscaremos investigar o efeito do CGP sobre moléculas de junção endotelial, como ocludina, claudina e VE-caderina, bem como uma possível ação deste dipeptídeo sobre a produção de endomucina pelas células endoteliais. Não descartamos a possibilidade de o CGP ter outros alvos celulares, como os neutrófilos.

Figura 29 – Ação do CGP sobre células endoteliais *in vitro*.



Fonte: Autor, 2020.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, M. A.; MCGAW, L. J. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: A mini review. *Molecules*, v. 23, n. 8, 2018.
- ABRAHAM, W.R..Fumitremorgins and Relatives - From Tremorgenic Compounds to Valuable Anti-Cancer Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 25 (2), 123-140, 2018.
- ADDERLEY, S.P.; ZHANG, X.E.; BRESLIN, J.W.. Involvement of the H1 Histamine Receptor, p38 MAP Kinase, Myosin Light Chains Kinase, and Rho/ROCK in Histamine-Induced Endothelial Barrier Dysfunction. *Microcirculation*, 22 (4), 237-48, 2015.
- ADINI, A.; ADINI, I.; CHI, Z. L.; DERDA, R.; BIRSNER, A. E.; MATTHEWS, B. D.; D'AMATO, R. J.. A novel strategy to enhance angiogenesis in vivo using the small VEGF-binding peptide PR1P. *Angiogenesis*, 20(3), 399–408, 2017.
- AL-TURKI, D.A.; ABOU-ZEID, L.A.; SHEHATA, I.A.; AL-OMAR, M.A. Therapeutic and toxic effects of new NSAIDs and related compounds: a review and prospective study. *International Journal of Pharmacology*, 6(6):813-825, 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica 13/2018. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Nota_TecnicaCOX2.pdf> Acesso em: 26 de junho de 2019.
- APTE, R.S.; CHEN, D.S.; FERRARA, N.. VEGF in Signaling and Disease : Beyond Discovery and Development. *Cell*, v. 176, n. 6, p. 1248–1264, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>>.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 43, n. 1, p. 120913143848009, 2012.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv.*, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA01911G>>.
- BADMAEVA, S. E; KOPYLOVA, G.N.; ABUSHINOVA, N.N.; SAMONINA, G.E.; UMAROVA, B.A. Effects of glyprolines on stress-induced behavioral disorders in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 36, n. 4, p. 409–413, 2006.
- BAKER, N.; O'MEARA, S.J.; SCANNELL, M.; MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxin A4: Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Impact on Endothelial Cells. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 6, p. 3819–3826, 2009.
- BARBOSA, B.F. Ação antinociceptiva do Cyclo(Gly-Pro) sobre a dor orofacial em roedores. São Cristóvão, Sergipe. 42p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Sergipe.
- BARNES, P. J. Corticosteroid effects on cell signalling. *European Respiratory Journal*, v. 27, n. 2, p. 413–426, 2006.
- BARNES, PETER J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology*, v. 148, n. 3, p. 245–254, 2006.

- BARROS, B.S.; SILVA, J.P.; FERRO, J.N.; AGRA, I.K.R.; BRITO, F.A.; ALBUQUERQUE, E.D.; CAETANO, L.C.; BARRETO, E. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia sp.* induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. *Journal of Natural Medicines*, 65(3-4), 526-531, 2011.
- BELLEZZA, I.; PEIRCE, M. J.; MINELLI, A. Cyclic dipeptides: from bugs to brain. *Trends in Molecular Medicine*, v. 20, n. 10, p. 551–558, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149141400135X>>.
- BHARGAVA, H.N. Intragastric administration of cyclo(Leu-Gly) inhibits the development of tolerance to the analgesic effect of morphine in the rat. *Life Sciences*, 43(2):187-192, 1988.
- BIERHANSL, L.; CONRADI, L.C.; TREPS, L.; DEWERCHIN, M.; CARMELIET, P.. Central Role of Metabolism in Endothelial Cell Function and Vascular Disease. *Physiology*, 32: 126–140, 2017. Disponível em: <doi:10.1152/physiol.00031.2016>
- BITAR, M. S.; AL-BUSTAN, M.; NEHME, C. L.; PILCHER, C. W. T. Antinociceptive action of intrathecally administered IGF-I and the expression of its receptor in rat spinal cord. *Brain Research*, 737(1-2), 292–294, 1996.
- BJARNASON, I.; SCARPIGNATO, C.; HOLMGREN, E.; OLSZEWSKI, M.; RAINSFORD, K.D.; LANAS, A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*, v. 154, n. 3, p. 500–514, 2018.
- BLACKBURN, M.R.; VANCE, C.O.; MORSCHL, E.; WILSON, C.N. Adenosine Receptors and Inflammation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 193, DOI 10.1007/978-3-540-89615-98,2009.
- BOOHAKER, R.J.; ZHANG, G.; LEE, M.W.; NEMEC, K.N.; SANTRA, S.; PEREZ, J.M.; KHALED, A.R. Rational development of a cytotoxic peptide to trigger cell death. *Molecular Pharmaceutics*, v. 9, n. 7, p. 2080–2093, 2012.
- BRAUNS, S.C.; MILNE, P. NAUDÉ, R.; VAN DE VENTER, M.. Selected Cyclic Dipeptides Inhibit Cancer Cell Growth and Induce Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells. *Anticancer Research*, 24 (3a), 1713-9, 2004.
- CASTELLANO, I.; DI TOMO, P.; DI PIETRO, N.; MANDATORI, D.; PIPINO, C.; FORMOSO, G.; NAPOLITANO, A.; PALUMBO, A.; PANDOLFI, A.. Anti-Inflammatory Activity of Marine Ovoidiol A in an In Vitro Model of Endothelial Dysfunction Induced by Hyperglycemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, 2018.
- CERUTTI, C.; RIDLEY, A.J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research*, 358, p. 31-38, 2017.
- CHAN, L.Y.; CRAIK, D.J.; DALY, N.L.. Dual-targeting anti-angiogenic cyclic peptides as potential drug leads for cancer therapy. *Scientific Reports*, n. September, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep35347>>.
- CHELOMBITKO, M. A. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, v. 73, n. 4, p. 199–202, 2018.

- CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.
- CHIAO, H.; FOSTER, S.; THOMAS, R.; LIPTON, J.; STAR, R.A. α -Melanocyte-stimulating hormone reduces endotoxin-induced liver inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 97, n. 9, p. 2038–2044, 1996.
- CHITRA, J.; SHIVANI, K.; VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 10, n. 2, p. 494–504, 2019.
- CHOI, K.S.; JOO, S.H.. Recent Trends in Cyclic Peptides as Therapeutic Agents and Biochemical Tools. *Biomolecules & Therapeutics (Seoul)*, 28(1): 18–24, 2020.
- COOPER, C.; CHAPURLAT, R.; AL-DAGHRI, N.; HERRERO-BEAUMONT, G.; BRUYÈRE, O.; RANNOU, F.; ROTH, R.; UEBELHART, D.; REGINSTER, J.Y.. Safety of Oral Non – Selective Non – Steroidal Anti – Inflammatory Drugs in Osteoarthritis : What Does the Literature Say ?. *Drugs & Aging*, v. 36, n. s1, p. 15–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40266-019-00660-1>>.
- CRAIGE, S. M.; KANT, S.; KEANEY JR, J. F. Reactive Oxygen Species in Endothelial Function – From Disease to Adaptation –. *Circulation Journal*, v. 79, n. 6, p. 1145–1155, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/79/6/79_CJ-15-0464/_article>.
- DALAL, P.J.; MULLER, W.A; SULLIVAN, D. P.. Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *The American Journal of Pathology*, n. January, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.11.004>>.
- DAVIS, G.E.; SENGER, D.R.. Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circulation Research*, 97:1093-1107, 2005.
- DE LAVOR, É. M.; FERNANDES, A.W.C.; TELES, R.B.A.; LEAL, A.E.B.P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; SILVA, M.G.; OLIVEIRA, A.P.; SILVA, J.C.; ARAÚJO, M.T.M.F.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; PICOT, L.; ALMEIDA, J.R.G.S. Essential oils and their major compounds in the treatment of chronic inflammation: A review of antioxidant potential in preclinical studies and molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, 2018.
- DEJANA, E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 4, p. 261–270, 2004.
- DOUGHERTY, P.G.; SAHNI, A.; PEI, D.. Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides. *Chemical Reviews*, 119 (17), 10241-10287, 2019.
- E-KOBON, T.; THONGARARM, P.; ROYTRAKUL, S.; MEESUK, L.; CHUMNANPUEN, P. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 14, p. 49–57, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2015.11.005>>.

ELSAYED, E.A.; ENSHASY, H.E.; WADAAN, M.A.M.; AZIZ, R. Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1–15, 2014.

ESPOSITO, B.; GAMBARA, G.; LEWIS, A.M.; PALOMBI, F.; D'ALESSIO, A.; TAYLOR, L.X.; GENAZZANI, A.A.; ZIPARO, E.; GALIONE, A.; CHURCHILL, G.C.; FILIPPINI, A.. NAADP Links Histamine H1 Receptors to Secretion of Von Willebrand Factor in Human Endothelial Cells. *Blood*, 117 (18), 4968-77, 2011.

ESSER, N.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J.; SCHEEN, A.J.; PAQUOT, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 105, n. 2, p. 141–150, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>>.

FADEN, A. I.; KNOBLACH, S.M.; CERNAK, I.; FAN, L.; VINK, R.; ARALDI, G.L.; FRICKE, S.; ROTH, B.L.; KOZIKOWSKI, A.P. Novel Diketopiperazine Enhances Motor and Cognitive Recovery after Traumatic Brain Injury in Rats and Shows Neuroprotection In Vitro and In Vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 23, n. 3, p. 342–354, 2003.

FAEHLING; M., KROLL, J.; FÖHR, K. J.; FELLBRICH, G.; MAYR, U.; TRISCHLER, G.; WALTENBERGER, J.. Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(13), 1805–1807, 2002.

FAVIA, A.; DESIDERI, M.; GAMBARA, G.; D'ALESSIO, A.; RUAS, M.; ESPOSITO, B.; DEL BUFALO, D.; PARRINGTON, J.; ZIPARO, E.; PALOMBI, F.; GALIONE, A.; FILIPPINI, A.. VEGF-induced Neoangiogenesis Is Mediated by NAADP and Two-Pore channel-2-dependent Ca²⁺ Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(44): E4706–E4715, 2014.

FERRO, J. N. DE S.; AQUINO, F.L.T.; BRITO, R.G.; SANTOS, P.L.; QUINTANS, J.S.S.; SOUZA, L.C.; ARAÚJO, A.F.; DIAZ, B.L.; LUCCA-JÚNIOR, W.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BARRETO, E.O. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 42, n. 12, p. 1287–1295, 2015.

FERRO, J.N.S. Efeito farmacológico da friedelina livre e complexada em hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos de inflamação em roedores. Maceió, 2016. 141p. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas.

FILIPPINI, A.; D'AMORE, A.; D'ALESSIO, A. Calcium Mobilization in Endothelial Cell Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4525, p. 1–13, 2019.

FIRUZI, O.; MIRI, R.; TAVAKKOLI, M.; SASO, L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Current medicinal chemistry*, v. 18, n. 25, p. 3871–88, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824100>>.

FLOWER, R.J.. The development of COX2 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 3, p. 179–191, 2003.

FORRESTER, S. J.; KIKUCHI, D.S.; HERNANDES, M.S.; XU, Q.; GRIENDLING, K.K. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research*, v. 122, n. 6, p. 877–902, 2018.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T.. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov Today*, 20 (1), 122-8, 2015.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 12, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd.2016.39>>.

GATLA, H.R.; MUNIRAJ, N.; THEVKAR, P.; YAVVARI, S.; SUKHAVASI, S.; MAKENA, M.R.. Regulation of Chemokines and Cytokines by Histone Deacetylases and an Update on Histone Decetylase Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5): 1110, 2019.

GAVINS, F.N.E.; LEONI, G.; GETTING, S.J. Annexin 1 and melanocortin peptide therapy for protection against ischaemic reperfusion damage in the heart. *The Scientific World Journal*, 6, 1008–1023, 2006.

GENSLER, L. S. Glucocorticoids: Complications to Anticipate and Prevent. *The Neurohospitalist*, v. 3, n. 2, p. 92–97, 2012.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, v. 16, p. 225–260, 1998.

GLEZEVA, N.; BAUGH, J. A. Role of inflammation in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction and its potential as a therapeutic target. *Heart Failure Reviews*, v. 19, n. 5, p. 681–694, 2014.

GONÇALVES, V.; GAUTIER, B.; CORIC, P.; BOUAZIZ, S.; LENOIR, C.; GARBAY, C.; VIDAL, M.; INGUIMBERT, N. Rational Design, Structure, and Biological Evaluation of Cyclic Peptides Mimicking the Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Medicinal Chemistry*, p. 5135–5146, 2007.

GOODENOUGH D.A.; Paul D.L.. Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Jul;1(1):a002576, 2009. doi: 10.1101/cshperspect.a002576.

GOWRISHANKAR, S.; SIVARANJANI, M.; KAMALADEVI, A.; RAVI, A.V.; BALAMURUGAN, K.; PANDIAN, S.K.. Cyclic Dipeptide Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) From Marine *Bacillus Amyloliquefaciens* Mitigates Biofilm Formation and Virulence in *Listeria Monocytogenes*. *Pathogens and Disease*, 74 (4), ftw017, 2016.

GOWRISHANKAR, S.; SIVARANJANI, M.; KAMALADEVI, A.; RAVI, A.V.; VALAMURUGAN, K.; PANDIAN, S.K. Quorum quelling efficacy of marine cyclic dipeptide -cyclo(L-leucyl-L-prolyl) against the uropathogen *Serratia marcescens*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 123, p. 326–336, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.013>>.

GUAN, et al.. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBP-3 to IGF-1. *Scientific Reports*, 4 : 4388, 2014.

- GUAN, J.; MATHAI, S.; HARRIS, P.; WEN, J.Y.; ZHANG, R.; BRIMBLE, M.; GLUCKMAN, P. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuropharmacology*, v. 53, n. 6, p. 749–762, 2007.
- GUAN, J.; GLUCKMAN, P. D. IGF-1 derived small neuropeptides and analogues: A novel strategy for the development of pharmaceuticals for neurological conditions. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 881–891, 2009.
- GUDASHEVA, T.A.; OSTROVSKAYA, R.U.; SEREDENIN, S.B.. Novel Technologies for Dipeptide Drugs Design and their Implantation. *Current Pharmaceutical Design*, 24, 3020–3027, 2018.
- GULATI, K.; GUHATHAKURTA, S.; JAGDISH, J.; RAI, N.; ARUNABHA, R. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology*, v. 4, n. 2, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://medcraveonline.com/MOJI/MOJI-04-00121.php>>.
- HALEY, R. M.; VON RECUM, H. A. Localized and targeted delivery of NSAIDs for treatment of inflammation: A review. *Experimental Biology and Medicine*, v. 244, n. 6, p. 433–444, 2019.
- HANANIA, N.A.; MOORE, R.H.. Anti-inflammatory activities of beta2-agonists. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 3(3):271-7, 2004.
- HASKÓ, G; CRONSTEIN, B.. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Frontiers in Immunology*, 4, 85, 2013.
- HOU, T.; TIEU, B.C.; RAY, S.; RECINOS III, A.; CUI, R.; TILTON, R.G.; BRASIER, A.R. Role of IL-6-gp130 signaling in vascular inflammation. *Current Cardiology Reviews*, (4):179-192, 2008.
- INGRAM, S.; DIOTALLEVI, M. Reactive oxygen species: rapid fire in inflammation. n. August, p. 30–33, 2017. Disponível em: <<http://www.biochemist.org/bio/03904/0030/039040030.pdf>>.
- JING, X.; JIN, K. A Gold Mine for Drug Discovery: Strategies to Develop Cyclic Peptides Into Therapies. *Medicinal Research Reviews*, 40 (2), 753-810, 2020.
- JOO, S.H.. Cyclic Peptides as Therapeutic Agents and Biochemical Tools. *Biomolecules and Therapeutics*, v. 20, n. 1, p. 19–26, 2012.
- JUNG, B.; KU, S.K.; GAO, M.; KIM, K.M.; HAN, M.S.; CHOI, H.; BAE, J.S. Suppressive effects of three diketopiperazines from marine-derived bacteria on TGFβ1-mediated septic responses in human endothelial cells and mice. *Archives of Pharmacal Research*, 39 (6): 843-854, 2016.
- KANG, H.; KU, S.W.; CHOI, H.; BAE, J.S. Three diketopiperazines from marine-derived bacteria inhibit LPS-induced endothelial inflammatory responses. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 26, n. 8, p. 1873–1876, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.030>>.

- KANY, S.; VOLLRATH, J.T.; RELJA, B.. Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23): 6008, 2019.
- KASPAR, A.A.; REICHERT, J.M.. Future Directions for Peptide Therapeutics Development. *Drug Discovery Today*, 18 (17-18), 807-17, 2013.
- KATSARA, M., TSELIOS, T., DERAOS, S., DERAOS, G., MATSOUKAS, M.-T., LAZOURA, E., APOSTOPOULOS, V. Round and round we go: cyclic peptides in disease. *Current Medicinal Chemistry*, 13(19), 2221–2232., 2006.
- KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 120, n. 1, p. 3–10, 2007.
- KERÄNEN, T.; HÖMMÖ, T.; HÄMÄLÄINEN, M.; MOILANEN, E.; KORHONEN, R. Anti-Inflammatory Effects of B2-Receptor Agonists Salbutamol and Terbutaline Are Mediated by MKP-1. *PLoS One*, 11(2):e0148144, 2016.
- KIM, T.H.; BAE, J.S. Ecklonia cava extracts inhibit lipopolysaccharide induced inflammatory responses in human endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1682–1687, 2010.
- KIRCHER, M.; HERHAUS, P.; SCHOTTELIUS, M.; BUCK, A.K.; WERNER, R.A.; WESTER, H.J.; KELLER, U.; LAPA, C.. CXCR4-directed Theranostics in Oncology and Inflammation. *Annals of Nuclear Medicine*, 32:503-511, 2018.
- KRISHNASWAMY, G.; KELLEY, J.; LAKSHMINARAYAN, Y.; SMITH, J.K.; CHI, D.S. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, v. 19, n. 2, p. 91–104, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090394>>.
- KOBAYASHI, K.; MATSUMOTO, S.; MORISHIMA, T.; KAWABE, T.; OKAMOTO, T.. Cimetidine Inhibits Cancer Cell Adhesion to Endothelial Cells and Prevents Metastasis by Blocking E-selectin Expression. *Cancer Research*, 60 (14), 3978-84, 2000.
- KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor : Structure : function relationship. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 94, p. 383–394, 2005.
- KUMAR, S.N.; DILEEP, C.; MOHANDAS, C.; NAMBISAN, B.; JAYAPRAKAS, C.A. Cyclo(D-Tyr-D-Phe): A new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from Bacillus sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Journal of Peptide Science*, v. 20, n. 3, p. 173–185, 2014.
- LAI, W.K.; ADAMS, D.H.. Angiogenesis and chronic inflammation; the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease. *Journal of Hepatology*, v. 42, p. 7–11, 2005.
- LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, p. 782–794, 2007.

- LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution?. *International Journal of Experimental Pathology*, (88): 85-94, 2007.
- LEE, W. J. IGF-I Exerts an Anti-inflammatory Effect on Skeletal Muscle Cells through Down-regulation of TLR4 Signaling. *Immune Network*, v. 11, n. 4, p. 223, 2011.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, v. 7, n. 9, p. 678–89, 2007.
- LIU, Y. SHAW, S.K.; MA, S.; YANG, L; LUSCINSKAS, F.W.; PARKOS, C.A.. Regulation of Leukocyte Transmigration: Cell Surface Interactions and Signaling Events. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 1, p. 7–13, 2004.
- LIU, Z.; YAN, S.; WANG, J.; XU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, S.; XU, X.; YANG, Q.; ZENG, X.; ZHOU, Y.; GU, X.; LU, S.; FU, Z.; FULTON, D. J.; WEINTRAUB, N. L.; CALDWELL, R. B.; ZHANG, W.; WU, C.; LIU, X. L.; CHEN; AHMAD, A.; KADDOUR-DJEBBAR, I.; AL-SHABRAWAY, M.; LI, Q.; JIANG, X.; SUN, Y.; SODHI, A.; SMITH, L.; HONG, M.; HUO, Y.. Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis. *Nature Communications*, 8(1), 584, 2017.
- LOIZOU, S.; LEKAKIS, I.; CHROUSOS, G.P.; MOUTSATSOU, P.. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 551–558, 2010.
- LÜ, J.-M.; LIN, P.H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 14, n. 4, p. 840–60, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754673>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2927345>>.
- LUCIETTO, F. R., MILNE, P. J., KILIAN, G., FROST, C. L., & VAN De VENTER, M.. The biological activity of the histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Ala) and cyclo(His-Gly). *Peptides*, 27(11), 2706–2714, 2006.
- RECIO, M.C.; I. ANDUJAR; J.L. RIOS. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 14, p. 2088–2103, 2012.
- MAIONE, F.; RUSSO, R.; KHAN, H.; MASCOLO, N. Medicinal plants with anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, v. 30, n. 12, p. 1343–1352, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1062761>>.
- MAKÓ, V.; CZÚCZ, J.; WEISZHÁR, Z.; HERCZENIK, E.; MATKÓ, J.; PROHÁSZKA, Z.; CERVENAK, L. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. *Cytometry Part A*, v. 77, n. 10, p. 962–970, 2010.
- MARTIN-LOECHES, I.; DALE, G.E.; TORRES, A.. Murepavadin: A New Antibiotic Class in the Pipeline. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16 (4), 259-268, 2018.

- MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, v. 63, n. 40, p. 9923–9932, 2007.
- MATSUDA, S.; KOYASU, S.. Mechanisms of Action of Cyclosporine. *Immunopharmacology*, 47 (2-3), 119-25, 2000.
- MCCULLOCH, C. A.; DOWNEY, G. P.; EL-GABALAWY, H. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: New targets for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 10, p. 864–876, 2006.
- MCEVER, R. P. Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular Research*, v. 107, n. 3, p. 331–339, 2015.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.
- MICHAELIS, U.R.. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71:4131-4148, 2014.
- MICHIELS, C. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, v. 196, n. 3, p. 430–443, 2003.
- MELO, I.; MEDEIROS, N.C.; FERRO, J.N.S.; ARAÚJO, P.M.C.; OLIVEIRA, T.L.; SANTOS, C.E.A.; SOUSA, L.C.; AGUIAR, E.M.G.; OLIVEIRA, S.W.; CASTRO, O.W.; BALVEDI, R.P.A.; RODRIGUES, L.P.; HICKMANN, J.M.; ALVES, D.A.; SANTOS, I.A.; JARDIM, A.C.; SIQUEIRA, W.L.; PIPI, A.R.F.; GOULART, L.R.; BARRETO, E.O.; SABINO-SILVA, R.. Restoration of Cyclo-Gly-Pro-induced Salivary Hyposecretion and Submandibular Composition by Naloxone in Mice. *PLoS One*, 15 (3), e0229761, DOI: 10.1371/journal.pone.0229761, 2020.
- MISHRA, A. K.; CHOI, J.; CHOI, S.J.; BAEK, K.H. Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules*, v. 22, n. 10, p. 1–13, 2017.
- MITTAL, M.; SIDDIQUI, M.R.; TRAN, K.; REDDY, S.P.; MALIK, A.B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*, v. 20, n. 7, p. 1126–67, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991888>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3929010>>.
- MOENS, U.; KOSTENKO, S.; SVEINBJØRNSSON, B. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. *Genes*, v. 4, p. 101–133, 2013.
- MOHAMMED, Y.; TEIXIDÓ, M.; NAMJOSHI, S.; GIRALT, E.; BENSON, H.. Cyclic Dipeptide Shuttles as a Novel Skin Penetration Enhancement Approach: Preliminary Evaluation With Diclofenac. *PLoS One*, 11 (8), e0160973, 2016.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 5563, 1983.

- NEVE, A.; CANTATORE, F.P.; MARUOTTI, N.; CORRADO, A.; RIBATTI, D. Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.
- NGAMSRI, K.C.; MÜLLER, A.; BÖSMÜLLER, H.; GAMPER-TSIGARAS, J.; REUTERSHAN, J.; KONRAD, F.M. The Pivotal Role of CXCR7 in Stabilization of the Pulmonary Epithelial Barrier in Acute Pulmonary Inflammation. *The Journal of Immunology*, 198:2403-2413, 2017.
- OKIN, DANIEL. MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. *Current Biology*, v. 22, n. 17, p. R733–R740, 2012.
- ONG, C. K. S.; LIRK, P.; TAN, C.H.; SEYMOUR, R.A. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical Medicine and Research*, v. 5, n. 1, p. 19–34, 2007.
- ORTIZ, A.; SANSINENEA, E.. Cyclic Dipeptides: Secondary Metabolites Isolated from Different Microorganisms with Diverse Biological Activities. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 2773-2780, 2017.
- OSAFO, N.; AGYARE, C.; OBIRI, D.D.; ANTWI, A.O. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IntechOpen, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/68090>> Acesso em: 09 de março de 2020.
- PATE, M.; DAMARLA, V.; CHI, D.S.; NEGI, S.; KRISHNASWAMY, G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 52, chapter 5, p.109-130, 2010.
- PEACH, C.; MIGNONE, V.W.; ARRUDA, M.A.; ALCOBIA, D.C.; HILL, S.J.; KILPATRICK, L.E.; WOOLARD, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms : Binding and Signalling at VEGFR2. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1264, 2018.
- PEREIRA-LEITE, C.; NUNES, C.; JAMAL, S.K.; CUCCOVIA, I.M.; REIS, S. Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: a journey toward safety. *Medicinal Research Reviews*, p.1-58, 2016.
- POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007.
- PRASAD, C. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, v. 16, n. 1, p. 151–164, 1995.
- RAJENDRAN, P.; RENGARANJAN, T.; THANGAVEL, J.; NISHIGAKI, Y. SAKTHISEKARAN, D.; SETHI, G.; NISHIGAKI, I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10):1057-1069, 2013. doi: 10.7150/ijbs.7502.
- RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J.A. Corticosteroids-mechanisms of action in health and disease. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 42(1):15-31, 2016.
- RAMOS, T.N.; BULLARD, D.C.; BARNUM, S.R. ICAM-1 Isoforms and Phenotypes.

The Journal of Immunology, 192(10): 4469-4474, 2014.

RAO, P.; KNAUS, E. E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 2, p. 81–110, 2008.

REDKO, B.; TUCHINSKY, H.; SEGAL, T.; TOBI, D.; LUBOSHITS, G.; ASHUR-FABIAN, O.; PINHASOV, A.; GERLITZ, G.; GELLERMAN, G. Toward the development of a novel non-RGD cyclic peptide drug conjugate for treatment of human metastatic melanoma. *Oncotarget*, v. 8, n. 1, p. 757–768, 2017.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M.A.; BASTOS, J.K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. *Pharmaceutical Biology*, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1454480>>.

RICCIOTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5): 986-1000, 2011.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1–2, p. 80–84, 2005.

RUSSO, R. C.; GARCIA, C.C.; TEIXEIRA, M.M.; AMARAL, F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 10, n. 5, p. 593–619, 2014.

SAFI, S.Z.; SHAH, H.; QVIST, R.; BINDAL, P.; MANSOR, M.; YAN, G.O.S.; ISMAIL, I.S.B.. Beta Adrenergic Receptors Stimulation Attenuates Phosphorylation of NF- κ B and I κ B α in Hyperglycemic Endothelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51:1429-1436, 2018.

SAINSON, R.C.A.; JOHNSTON, D.A.; CHU, H.C.; HOLDERFIELD, M.T.; NAKATSU, M.N.; CRAMPTON, S.P.; DAVIS, J.; CONN, E.; HUGHES, C.C.W. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood*, 111:4997-5007, 2008.

SAKAI, R.; SWANSON, G.T.. Recent Progress in Neuroactive Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 31(2): 273–309, 2014.

SAMONINA, G.; ASHMARIN, I.; LYAPINA, L. Glyproline peptide family: Review on bioactivity and possible origins. *Pathophysiology*, v. 8, n. 4, p. 229–234, 2002.

SCHELLACK, N.; SCHELLACK, G.; FOURIE, J. A review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *South African Pharmaceutical Journal*, v. 82, n. 3, p. 8–18, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742337>>.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. Biochimica et Biophysica Acta The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 878–888, 2011.

SCHOLZEN, T. E.; SUNDERKÖTTER, C.; KALDEN, D.H.; BRZOSKA, T.;

FASTRICH, M.; FISBECK, T.; ARMSTRONG, C.A.; ANSEL, J.C.; LUGER, T.A. α -Melanocyte Stimulating Hormone Prevents Lipopolysaccharide-Induced Vasculitis By Down-Regulating Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression. *Endocrinology*, v. 144, n. 1, p. 360–370, 2003.

SHIBUYA, M.. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- And Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2 (12), 1097-105, 2011.

SILVA, M.; VIDEIRA, P. A.; SACKSTEIN, R. E-selectin ligands in the human mononuclear phagocyte system: implications for infection, inflammation, and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. January, p. 1–17, 2018.

SIMON, G.; BÉRUBÉ, C.; VOYER, N.; GREINER, D. Anti-biofilm and anti-adherence properties of novel cyclic dipeptides against oral pathogens. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.042>>.

SIMONS, M.; GORDON, E.; CLAESSEON-WELSH, L.. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, v. 17, n. 10, p. 611–625, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.87>>.

SLIM, K. JORIS, J.; BELOEIL, H., Le Groupe Francophone de Réhabilitation Améliorée après Chirurgie (GRACE). Colonic anastomoses and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Visceral Surgery*, 153(4):269-275, 2016.

SOROKA, V.; KASPER, C.; POULSEN, F. M. Structural Biology of NCAM. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 663, p. 3–22, 2010.

STAHN, S.; THELEN, L.; ALBRECHT, I.M; BITZER, J.; HENHEL, T.; TEUSCH, N.E.. Teleocidin A2 inhibits human proteinase-activated receptor 2 signaling in tumor cells. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 4, p. 1–18, 2016.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Research*, v. 2, p. 378–385, 2000.

STRINDHALL, J.; LINDGREN, P.E.; KIHLESTRÖM, S.L. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* vary in ability to stimulate cytokine expression in human endothelial cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 61, n. 1, p. 57–62, 2005.

STRÖM, K.; SJÖRGEN, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 9, p. 4322–4327, 2002. Disponível em: <<http://www.internetworld.de/onlinemarketing/online-werbung/kosten-online-werbung-teure-technische-helferlein-1062268.html>>.

SUGIMOTO, M. A.; SOUSA, L.P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: What controls its onset? *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. APR, 2016.

SUKRITI, S.; TAUSEEF, M.; YAZBECK, P.; MEHTA, D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulmonary Circulation*, 4(4):535-551, 2014.

SZOLLOSI, D. E.; MANZOOR, M.K.; AQUILATO, A.; JACKSON, P.; GHONEIM,

- O.M.; EDAFIOGHO, I.O. Current and novel anti-inflammatory drug targets for inhibition of cytokines and leucocyte recruitment in rheumatic diseases. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 70, p. 18–26, 2018.
- TAHERGORABI, Z.; KHAZAEI, M.. A Review on Angiogenesis and Its Assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 15, n. 6, p. 1110–1126, 2012.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v. 6, p. 1–16, 2014.
- TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 4, n. 11, p. 897–901, 2003.
- TIRUPPATHI, C.; MINSHALL, R.D.; PARIJA, B.C.; VOGEL, S.M.; MALIK, A.B.. Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*, v. 39, p. 173–185, 2003.
- TRAN, P.O.; HINMAN, L.E.; UNGER, G.M.; SAMMAK, P.J.. A Wound-Induced [Ca²⁺]_i Increase and Its Transcriptional Activation of Immediate Early Genes Is Important in the Regulation of Motility. *Experimental Cell Research*, 246(2), 319-26, 1999.
- TRIBOLO, S.; LODI, F.; CONNOR, C.; SURI, S.; WILSON, V.G.; TAYOR, M.A.; NEEDS, P.W.; KROON, P.A.; HUGHES, D.A.. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, v. 197, p. 50–56, 2008.
- TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines : At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>>.
- UMAROVA, B. A., BONDARENKO, N. S., KOPYLOVA, G. N., SAMONINA, G. E. The effect of PGP on β -hexosaminidase and histamine secretion in rat peritoneal mast cells *in vitro*. *Biochemistry Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 5(3), 237–241, 2011.
- VAN BUUL, J. D.; KANTERS, E.; HORDIJK, P. L. Endothelial signalling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, p. 1870-1876, 2008.
- VO, T.S.; KIM, S.K.. Down-regulation of histamine-induced endothelial cell activation as potential anti-atherosclerotic activity of peptides from *Spirulina maxima*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9;50(2):198-207, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.07.001>>.
- WALLEZ, Y.; HUBER, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778, p. 794–809, 2008.
- WEI, W.C.; SUNG, P.J.; DUH, C.Y.; CHEN, B.W.; SHEU, J.H.; YANG, N.S.. Anti-inflammatory activities of natural products isolated from soft corals of Taiwan between 2008 and 2012. *Marine Drugs*, v. 11, n. 10, p. 4083–4126, 2013.

WONGRAKPANICH, S.; WONGRAKPANICH, A.; MELHADO, K.; RANGASWAMI, J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drugs use in the elderly. *Aging and Disease*, vol.9, n.1, p.143-150, 2018.

World Health Organization. The top 10 causes of death. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>> Acesso em: 26 de junho de 2019.

WU, L.; WALAS, S.; LEUNG, W.; SYKES, D.B.; WU, J.; LO, E.H.; LOK, J. Neuregulin1- β decreases IL-1 β -induced neutrophil adhesion to human brain microvascular endothelial cells. *Translational Stroke Research*, 6(2): 116-124, 2015.

YAN, S.; ZHANG, X.; ZHENG, H.; HU, D.; ZHANG, Y.; GUAN, Q.; LIU, L.; DING, Q.; LI, Y. Clematicinenoside inhibits VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- α -treated endothelial cells via NADPH oxidase-dependent I κ B kinase/NF- κ B pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 78, p. 190–201, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.004>>.

YANG, S. C.; SUNG, P.J.; LIN, C.F.; KUO, J.; CHEN, C.Y.; HWANG, T.L. Anti-inflammatory effects of secondary metabolites of marine *Pseudomonas sp.* in human neutrophils are through inhibiting P38 MAPK, JNK, and calcium pathways. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. 1–17, 2014.

YAU, J.W.; TEOH, H.; VERMA, S.. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders*, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12872-015-0124-z>>.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4): 655-683, 2011.

ZHR, A.; ALCAIDE, P.; YANG, J.; JONES, A.; GREGORY, M.; DE LA PAZ, N.G.; PATEL-HETT, S.; NEVERS, T.; KOIRALA, A.; LUSCINKAS, F.W.; SAINT-GENIEZ, M.; KSANDER, B.; D'AMORE, P.A.; ARGÜESO, P. Endomucin prevents leukocyte-endothelial cell adhesion and has a critical role under resting and inflammatory conditions. *Nature Communications*, v. 7, 2016.

ZHANG, H.; PARK, Y.; WU, J.; CHEN, X.P.; LEE, S.; YANG, J.; DELLSPERGER, K.C.; ZHANG, C. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clinical Science*, v. 116, n. 3, p. 219–230, 2009. Disponível em: <<http://www.clinsci.org/cgi/doi/10.1042/CS20080196>>.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Research in Cardiology*, 103(5): 398-406, 2008.

ZHAO, J.; MITROFAN, C.G.; APPLEBY, S.L.; MORRELL, N.W.; LEVER, A.M.. Disrupted Endothelial Cell Layer and Exposed Extracellular Matrix Proteins Promote Capture of Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells. *Stem Cells International*, v. 2016, 2016.

ZHENG, Y.; TOBOREK, M.; HENNIG, B. Epigallocatechin gallate – mediated

protection against tumor necrosis factor- α – induced monocyte chemoattractant protein – 1 expression is heme oxygenase – 1 dependent. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 59, n. 10, p. 1528–1535, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2010.01.018>>.

ZORZI, A.; DEYLE, K.; HEINIS, C. Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 38, p. 24–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.006>>.