

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Síntese e Avaliação Biológica de Novos Derivados 5-Benzilideno-3-Benzil-Tiazolidina-2,4-diona: Futuros Candidatos a Fármacos na Terapêutica do Tratamento de Doenças Autoimunes, como Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide

Aluna: Juliana Cruz da Silva

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Co-orientadoras: Maria do Carmo Alves de Lima

Maira Galdino da Rocha Pitta

Recife, fevereiro de 2012

Juliana Cruz da Silva

Síntese e Avaliação Biológica de Novos Derivados 5-Benzilideno-3-Benzil-Tiazolidina-2,4-diona: Futuros Candidatos a Fármacos na Terapêutica do Tratamento de Doenças Autoimunes, como Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração Química Medicinal.

ORIENTADOR:

Prof^o Dr^o Ivan da Rocha Pitta - Departamento de Antibióticos

CO-ORIENTADORAS:

Prof^a Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima - Departamento de Antibióticos

Prof^a Dr^a Maira Galdino da Rocha Pitta - Departamento de Bioquímica

Recife, fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

REITOR:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR:

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Francisco de Souza Ramos

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS:**

Prof^a. Maria Tereza dos Santos Correia

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**

Prof.^o Ranilson de Souza Bezerra

Silva, Juliana Cruz da

Síntese e avaliação biológica de novos derivados 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona: futuros candidatos a fármacos na terapêutica do tratamento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide/ Juliana Cruz da Silva. – Recife: O Autor, 2012.

185 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientadoras: Maria do Carmo Alves de Lima e Maíra Galdino da Rocha Pitta

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Química Medicinal, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Tiazóis 2. Lupus eritematoso sistêmico 3. Artrite reumatoide
I. Pitta, Ivan da Rocha II. Lima, Maria do Carmo Alves de III.
Pitta, Maíra Galdino da Rocha IV. Título**

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-071



PPGCB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Recife, 27 de fevereiro de 2012

Tese de Doutorado defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

Prof^o Dr^o Ivan da Rocha Pitta (Orientador)

(Departamento de Antibióticos - UFPE)

Prof^a Dr^a Paloma Lys de Medeiros

(Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE)

Prof^a Dr^a Ângela Luzia Branco Pinto Duarte

(Departamento de Reumatologia - UFPE)

Prof^a Dr^a Maria Danielly Lima de Oliveira

(Departamento de Bioquímica - UFPE)

Prof^a Dr^a Janaína de Albuquerque Couto

(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

*“Quanto mais envelheço, mais acredito na lei
pela qual florescem o lírio e a rosa.”
(Johann Wolfgang Von Goethe)*

DEDICATÓRIA

A Deus, razão de tudo o que somos e fazemos;

Aos meus pais, Alberto Luiz e Edilene Cruz, razão maior de minha existência e exemplo de amor com que fui criada;

Ao meu irmão Felipe Luiz e ao meu sobrinho Luiz Felipe, pessoas queridas e especiais;

Ao meu esposo Leônidas Américo, pelo amor, incentivo, apoio incondicional, companheirismo e suporte emocional;

A minha filha Sophie Cruz, que iluminou o meu caminho, com o meu amor e como incentivo para a sua vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que me deu saúde e sabedoria para realização deste trabalho.

Ao professor Ivan da Rocha Pitta do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/GPIT do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade concedida para desenvolver este trabalho;

A professora Suely Lins Galdino do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/GPIT do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Maria do Carmo Alves de Lima do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/GPIT do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade concedida, sua maneira cativante de ensinar e incentivar nos momentos mais precisos e não precisos.

A professora Maíra Galdino da Rocha Pitta, pela oportunidade concedida de trabalhar no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT, assim como por estar sempre disponível para construção deste trabalho.

A professora Teresinha Gonçalves da Silva do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos – LBPF do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pela orientação na avaliação biológica in vivo, assim como, o apoio nos momentos de dúvidas.

A professora Maria Tereza dos Santos Correia, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas – PPGCB, pelo apoio, suporte e disponibilidade.

A Adenilda Eugênia de Lima, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela paciência e disponibilidade durante o curso.

A FACEPE, pelo suporte financeiro.

A todos os profissionais do Ambulatório de Reumatologia, coordenado pela professora Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, do Hospital das Clínicas de Pernambuco, pela colaboração na construção de parte deste trabalho;

A todos os amigos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos (UFPE): Cleiton Diniz Barros, Aracelly de França Luis,

Luiz Carlos Apolinário da Silva, Tiago Bento de Oliveira, Sandra Sarinho, Janaína Couto, Antônio Sérgio, Jamerson Oliveira e Talitha Lima.

As queridas amigas Anekécia Lauro da Silva, Fabiana Gomes e Nathália Colaço pelos momentos de companheirismo e alegria.

Aos amigos Micheline Miranda, Ricardo Olímpio, Andrea Apolinário e Juliana Lemoine e Artur Barbosa, que mesmo distante estiveram sempre presentes durante o período do doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas: Emanuella Moura, Priscilla Oliveira, Flaviana Santos, Mariana Brayner, Pablo Cardoso, Sayonara Gonçalves, Rafael Ramos, Elisângela Mendonça, Moacyr Rêgo, Laurindo Rocha e Elaine Heide.

A Ricardo Oliveira e Eliete Barros, da Central de Química Analítica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio;

Aos amigos Auxiliadora e Afrânio França, pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho;

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram em especial a minha mãe, ao meu pai, meu irmão, meu esposo e a minha filha.

A todos, que de alguma forma, contribuíram de maneira direta ou indireta para minha formação acadêmica e concretização deste trabalho.

RESUMO

Entre os fármacos que são utilizados na terapêutica do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR) destacam-se os anti-maláricos como a cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ) e os glicocorticoides que exercem graves efeitos colaterais. Entre os efeitos biológicos da CQ e da HCQ que são descritos na literatura destaca-se à inibição de um número restrito de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IFN γ , TNF α e IL-6. No entanto, ainda não está relatado o efeito desses compostos diante das citocinas pró-inflamatórias da via Th17, como IL-17 e IL-22. Também são estudadas as citocinas que inibem a via Th17 como, por exemplo, a IL-27 considerada como anti-inflamatória, em alguns estudos. Porém existem poucos trabalhos da relação desta citocina com os níveis séricos em pacientes portadores de doenças autoimunes. A necessidade de novos fármacos anti-inflamatórios com menos efeitos adversos direcionam estudiosos à descoberta de novos compostos. As tiazolidinas-2,4-dionas são substâncias promissoras devido aos efeitos anti-inflamatórios via PPAR γ . Foram sintetizados dez novos compostos derivados da tiazolidina-2,4-diona para posterior avaliação anti-inflamatória *in vitro*, em células esplênicas, e *in vivo*, através do protocolo experimental de air-pouch. Partindo-se da tiazolidina-2,4-diona, os derivados sintetizados foram obtidos por reações de N-alkilação, na posição 3 da tiazolidina-2,4-diona, e por reações de Michael, na posição 5 do núcleo. As estruturas químicas dos compostos sintetizados foram devidamente comprovadas por RMN ^1H , IV e EM. Os resultados da avaliação anti-inflamatória *in vitro* demonstraram que os compostos 3-(2-bromo-benzil)-5-(3-bromo-6-metóxi-benzilideno)-tiazoldina-2,4-diona (LPSF/GQ-113B), 3-(2-bromo-benzil)-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-92) e 3-(3-flúor-benzil)-5-(4-metil-sulfonil-benzilideno)-tiazoldina-2,4-diona (LPSF/GQ-57) apresentaram atividade de inibição da síntese das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 em células esplênicas provenientes de camundongos BALB/c. Na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*, no modelo de air-pouch induzido por carragenina, os mesmos compostos apresentaram percentuais de inibição da migração celular superior a 50%, na dose de 3 mg/kg. Os compostos mencionados possuem ação inibitória da resposta inflamatória induzida por carragenina revelando a potencial ação anti-inflamatória dos derivados das tiazolidinas-2,4-dionas 3,5-dissubstituídos. Em paralelo, o efeito da CQ e da HCQ foi avaliado em sobrenadantes de cultura de células esplênicas, em PBMCs de voluntários saudáveis e, em pacientes com LES ou AR. Os resultados indicaram que houve inibição da síntese de IL-17, em esplenócitos, assim como de IL-17 e IL-22 em PBMCs de voluntários saudáveis e de pacientes com LES ou AR. Também foi avaliada a correlação dos níveis de IL-27 em soro de pacientes portadores de LES com a atividade da doença (SLEDAI) e nefrite. Os resultados demonstraram que há níveis reduzidos de IL-27 nos pacientes com LES quando comparados ao grupo controle. No entanto, os resultados da correlação com SLEDAI e nefrite não foram significativos, quando comparados ao controle.

PALAVRAS-CHAVE: atividade anti-inflamatória, air-pouch, esplenócitos, IL-17, derivados tiazolidínicos.

ABSTRACT

Among the drugs that are used in the treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) stand out anti-malarials such as chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ) and glucocorticoids that exert severe side effects. Among the biological effects of the CQ and HCQ of which are described in the literature highlights to the inhibition of a limited number of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-6. However, is not reported the effects of these compounds on the pro-inflammatory cytokines track Th17, such as IL-17 and IL-22. We also studied the cytokines that inhibit the pathway Th17 such as IL-27 treated as anti-inflammatory, in some studies. But there are few studies of the relationship of this cytokine serum levels in patients with autoimmune diseases. The need for new anti-inflammatory drugs with fewer adverse effects direct researchers to the discovery of new compounds. The thiazolidines-2,4-diones substances are promising due to anti-inflammatory effects through PPAR γ . Ten new compounds were synthesized derivatives of thiazolidine-2,4-dione for further evaluation *in vitro* anti-inflammatory, in splenic cells, and *in vivo* experimental protocol through the air-pouch. Starting from the thiazolidine-2,4-dione derivatives synthesized were obtained by N-alkylation reactions, at position 3 of the thiazolidine-2,4-dione, Michael reactions, at position 5 of the core. The chemical structures of compounds synthesized were fully confirmed by ^1H NMR, IR and MS. The results of the anti-inflammatory *in vitro* have demonstrated that the compounds 3-(2-bromo-benzyl)-5-(3-bromo-6-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-113B), 3-(2-bromo-benzyl)-5-(4-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-92) and 3-(3-fluoro-benzyl)-5-(4-methylsulphonyl-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-57) showed activity in inhibition of pro-inflammatory cytokines IFN- γ and IL-17 in spleen cells from BALB/c. In the evaluation of anti-inflammatory activity *in vivo* in the air-pouch model by carrageenan-induced, the same compounds showed percentage inhibition of cell migration greater than 50% at a dose of 3 mg / Kg. The compounds mentioned have the inhibitory action of the carrageenan induced inflammatory response revealing potential anti-inflammatory derivatives of thiazolidines-2,4-diones 3,5-disubstituted. In parallel, the effect of the CQ and HCQ was evaluated in the culture supernatants of spleen cells in PBMCs from healthy volunteers and in patients with SLE or RA. The results indicated an inhibition of IL-17 in spleen, as well as IL-17 and IL-22 in PBMCs from healthy volunteers and from patients with SLE or RA. We also analyzed the correlation of IL-27 levels in sera of SLE patients with active disease (SLEDAI) and lupus nephritis. The results showed that there are low levels of IL-27 in SLE patients compared to controls. However, the results of correlation with SLEDAI and nephritis were not significant when compared to control.

KEY WORDS: anti-inflammatory activity, air-pouch, splenocytes, IL-17, thiazolidinedione derivatives.

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Eritema malar no LES	32
Figura 2. Citocinas envolvidas na diferenciação dos linfócitos T CD4 ⁺	36
Figura 3. Estrutura da prednisolona e metilprednisolona	38
Figura 4. Estrutura da cloroquina (A) e da hidroxicloroquina (B)	39
Figura 5. Estrutura da troglitazona (A), pioglitazona (B) e rosiglitazona (C)	47
Figura 6. Estrutura da ciglitazona	48
Figura 7. Derivados 2,3-diaril-1,3-tiazolidina-4-ona	49
Figura 8. Compostos tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos sintetizados	50
Figura 9. Estrutura do derivado AS605240	50
Figura 10. Derivado LPSF/HQ com atividade analgésica	51
Figura 11. Tiazolidinas sintetizadas por Santos e colaboradores em 2005	51
Figura 12. 5-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona	52
Figura 13. Derivado LPSF/SF-23	52
Figura 14. LPSF/GQ (A) como agonista do PPAR α (B)	53
Figura 15. LPSF/SF-13 (A) (roxo) sobreposto a rosiglitazona (azul) no estudo de “docking” (B)	54
Figura 16. Formação da ligação de hidrogênio do LPSF/GQ-24 (A) (azul) e o GW 409544 (verde) no sítio ativo do PPAR (B)	54
Esquema 1. Reações que ocorrem na posição 3 e 5 do núcleo tiazolidina-2,4-diona	43
Esquema 2. Derivados tiazolidínicos 3-substituídos obtidos com NaOH em etanol	44
Esquema 3. Reação de Knoevenagel na posição 5 do núcleo tiazolidina-2,4-diona	45
Esquema 4. Compostos 3,5-dissubstituídos obtidos com acrilatos de etila	45

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMA DO ARTIGO 1

Scheme 1. Synthetic route for 3,5-disubstituted-2,4 thiazolidinedione derivatives 97

Figure 1. Determination of IFN- γ concentrations in supernatant of the spleen 101
cells. The concentrations of IFN- γ in the cells treated with compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-62, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92, LPSF/GQ-113B, LPSF/GQ-114 and LPSF/GQ-118 significantly decreased ($p < 0.05$) in the concentration of 100 μ M, compared with control cell.

Figure 2. Levels released of IL-17A in supernatant into the culture medium 102
measured by ELISA at spleen cells. The concentrations of IL-17A in the cells treated with compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B significantly ($p < 0.05$) decreased in the concentration of 100 μ M, compared with control cells. All data was expressed relative to larger values.

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1. Inhibition of the production of IL-17A by CQ (A) and HCQ (B) at doses of 5, 10, 25, 50, 100 μ M in spleen cells from BALB / c mice.	125
Figure 2. Inhibition of production of IL-17 (A) and IL-22 (B) by CQ and HCQ at doses of 25, 50, 100 μ M in PBMCs from healthy volunteers.	126
Figure 3. Inhibition of the production of IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-22 (C) of the HCQ at dose of 100 μ M in PBMCs from RA patients.	127
Figure 4. Inhibition of production of IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-22 (C) of the HCQ at dose of 100 μ M in PBMCs from SLE patients.	128

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 3

Figure 1. Serum IL-27 levels in SLE patients and controls (p=0.0004).	147
Figure 2. Association of serum IL-27 levels with disease activity evaluated by SLEDAI score (p=0.624) (A), and anti-dsDNA positivity (p=0.073) (B) in SLE patients.	148

LISTA DE TABELAS ARTIGO 1

Table 1. Physical and HRMS data of compounds	98
Table 2. Spectral data of compounds	99
Table 3. Viability spleens cell in the presence of the synthesized compounds	100
Table 4. Anti-inflammatory activity of the thiazolidinediones derivatives using the air-pouch model	103

LISTA DE TABELAS ARTIGO 2

Table 1. Demographic, clinical and current drugs of the patients with RA and SLE	129
Table 2. Levels of IL-17A in culture supernatants of splenocytes from BALB/c	130
Table 3. Levels of IL-17A in PBMCs from healthy volunteers	131
Table 4. Levels of cytokines in PBMCs from patients with RA	132
Table 5. Levels of cytokines in PBMCs from patients with SLE	133

LISTA DE TABELAS ARTIGO 3

Table 1. Demographic, clinical and laboratory findings in SLE patients	146
--	-----

LISTA DE ABREVIACÕES

ACR - Antigen-Presenting Cells
CAA – Células apresentadoras de antígenos
AR - Artrite Reumatoide
Con A – Concanavalina A
CQ - Cloroquina
COX-2 – Cicloxigenase do tipo 2
DMF - Dimetilformamida
DMSO - Dimetilsulfóxido
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH - Etanol
GPIT - Grupo de Pesquisa e Inovação Terapêutica
HCQ - Hidroxicloroquina
IFN- α – Interferon alfa
IFN γ – Interferon gamma
IL - Interleucinas
IV - Infravermelho
LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico
LIKA- Laboratório de Imunologia Keizo Asami
LINAT – Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
LPS - Lipopolissacarídeo
LPSF – Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
MP - Metilprednisolona
MS – Massas (espectrofotometria)
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell
RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SD - Standard Deviation
SDS - Sodium Dodecyl Sulfate
SLEDAI - SLE Disease Activity Index

NF- κ B – Fator de Transcrição nuclear kappa B

PHA - Phytohemagglutinin

PMA - Phorbol Myristate Acetate

PPAR - Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma

S_N2 – Substituição Nucleofílica de Segunda Ordem

Th – Linfócitos T auxiliares

THF - Tetrahydrofurano

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Figuras e Esquemas da Revisão Bibliográfica	xi
Lista de Figuras e Esquema do Artigo 1	xii
Lista de Figuras do Artigo 2	xiii
Lista de Figuras do Artigo 3	xiv
Lista de Tabelas Artigo 1	xv
Lista de Tabelas Artigo 2	xvi
Lista de Tabelas Artigo 3	xvi
Lista de Abreviações	xvii
1. Introdução	23
2. Objetivos	26
2.1. Geral	26
2.2. Específico	26
3. Justificativas	29
4. Revisão Bibliográfica	31
4.1. Inflamação Crônica	31
4.2. Doenças Relacionadas com a Inflamação Crônica: Lúpus e Artrite Reumatóide	31
4.3. Linfócitos T e Citocinas Envolvidas no Processo Inflamatório	33
4.3.1. Vias Th1 e Th2	33
4.3.2. Via Th17	34
4.3.3. Regulação das Vias Th1, Th2 e Th17: IL-27 como uma citocina anti-inflamatória	35
4.4. Anti-inflamatórios Utilizados na Terapêutica das Doenças Auto-imunes	37
4.4.1. Glicocorticoides	37
4.4.2. Antimaláricos: Desenvolvimento, Propriedades e Mecanismo de Ação	38
4.4.2.1. Atividade Anti-inflamatória da Cloroquina e Hidroxicloroquina	39
4.5. Desenvolvimento de Novos Fármacos Anti-inflamatórios	42
4.5.1. Reatividade do Núcleo Tiazolidina-2,4-diona	43

4.5.2. Atividade Anti-inflamatória dos PPAR γ	46
4.5.2.1. Atividade Anti-inflamatória das Tiazolidinas-2,4-dionas como Ativadoras de PPAR γ	47
4.5.3. Bioatividade dos Compostos Tiazolidínicos	49
5. Referências da Revisão Bibliográfica	57
Artigo 1	79
Synthesis and anti-inflammatory activity of 3,5-Disubstituted-2,4-thiazolidinedione derivatives	80
Artigo II	105
Chloroquine and hydroxychloroquine immunomodulatory effect in Th17 pathway	106
Artigo III	135
Decreased serum interleukin 27 in Brazilian systemic lupus erythematosus patients	136
6. Conclusões	150
7. Perspectivas	153
8. Anexos	155
8.1. Metodologias Aplicadas	155
8.1.2. Síntese dos Compostos	155
8.1.2.2. Síntese da tiazolidina-2,4-diona	155
8.1.2.3. Método Geral de Síntese dos Derivados 3-(2-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-54) e 3-(3-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-56)	156
8.1.2.4. Método Geral de Síntese dos Ésteres 2-Ciano-3-fenil-acrilatos de etila (LPSF/IP)	156
8.1.2.5. Método Geral de Síntese dos Derivados Tiazolidínicos (LPSF/GQ)	156
8.1.3. Avaliação biológica	157
8.1.3.1. Obtenção e cultura das células esplênicas	157
8.1.3.2. Pacientes e voluntários sadios	158
8.1.3.3. Coleta de sangue	158
8.1.3.4. Separação do soro	158
8.1.3.5. Purificação e cultura das PBMCs	159

8.1.3.6. Determinação de citocinas	159
8.1.3.7. Teste de viabilidade celular por MTT	159
8.1.3.8. Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> pelo método air-pouch	160
8.1.4. Referências das Metodologias	161
8.2. Normas das Revistas	165
8.2.1. Normas Acta Pharmaceutica	165
8.2.2. Normas Rheumatology	171
8.2.3. Normas Lupus: An International Journal	183
8.3. Submissão Artigo 3	185

Introdução

1. Introdução

A resposta inflamatória crônica está presente em inúmeras enfermidades entre elas destacam-se as doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), caracterizado por sintomas multissistêmicos, e a artrite reumatoide (AR), caracterizada pela inflamação crônica das articulações.

Para o tratamento das doenças inflamatórias crônicas são utilizados vários grupos de medicamentos. Entre eles estão os glicocorticoides que exercemos os mais potentes efeitos colaterais, em particular os que comprometem o sistema imune quando a terapia é crônica. Podemos destacar também os antimaláricos, como a cloroquina (CQ) e a hidroxicloroquina (HCQ), que são utilizados no tratamento do LES e da AR como monoterápicos ou em associação com outros medicamentos.

Os efeitos anti-inflamatórios da CQ e da HCQ são descritos na literatura devido a inibição de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-6 . No entanto, um novo subconjunto de células T auxiliares, chamadas células Th17, têm sido estudadas, uma vez que citocinas secretadas por esta via estão presentes de forma patogênica em doenças autoimunes. Em contraste, também são estudadas na literatura citocinas que inibem a via Th17 como, por exemplo, a IL-27 considerada em muitos trabalhos como anti-inflamatória.

Entre as substâncias que modulam o processo inflamatório crônico destaca-se o $\text{PPAR}\gamma$, receptor nuclear envolvido na participação da síntese e imunoregulação de citocinas em vários tipos celulares. Ainda, estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando ligantes sintéticos de $\text{PPAR}\gamma$ mostraram inibição de mediadores pró-inflamatórios pela via do fator de transcrição nuclear $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Dessa forma, os mediadores químicos participantes do processo inflamatório crônico são importantes alvos biológicos que possibilitam à pesquisa farmacêutica o desenvolvimento racional de novos compostos anti-inflamatórios. Assim, as doenças que envolvem a inflamação crônica se tornam alvo de grande interesse e atratividade para o desenvolvimento de novas drogas.

Dentre as substâncias que estão sendo intensivamente investigadas como possíveis fármacos anti-inflamatórios merecem destaque as tiazolidinas-2,4-dionas, que

são ligantes sintéticos de PPAR γ . Esses heterocíclicos pentagonais de amplo espectro farmacológico e alta reatividade química podem representar à indústria farmacêutica uma saída para as restrições advindas dos anti-inflamatórios já existentes como, por exemplo, os efeitos colaterais.

O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/GPIT/UFPE) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco tem trabalhado na síntese, no planejamento e na avaliação das propriedades farmacológicas de derivados tiazolidínicos. Empregando-se métodos fundamentados em diferentes estratégias da Química Medicinal, tem-se obtidos resultados animadores no desenvolvimento de derivados tiazolidínicos bioativos potenciais candidatos a fármacos. Entre esses estudos, destacam-se os derivados da tiazolidina-2,4-diona que apresentaram atividade anti-inflamatória e atividade no sítio do PPAR γ (SANTOS et al., 2005; PEREIRA, 2007; UCHÔA et al., 2009; BARROS et al., 2010; MAGALHÃES, 2007; LEITE et al., 2007).

Diante do exposto, o presente estudo propõe no capítulo I a síntese, elucidação estrutural e a avaliação biológica *in vitro* e *in vivo* de novas moléculas derivadas do núcleo tiazolidina-2,4-diona a fim de contribuir na descoberta de novos fármacos.

No capítulo II, abrangeremos um estudo direcionado à imunomodulação de antimaláricos, cloroquina e hidroxicloroquina, diante da via Th17. Apresentaremos a quantificação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IL-22, em esplenócitos provenientes de BALB/c, assim como em células mononucleares provenientes de voluntários sadios e de pacientes com LES ou AR após estimulação mitogênica.

Em seguida, no capítulo III, demonstraremos a correlação de IL-27 com LES, visto que, existem poucos estudos que avaliaram os níveis séricos de IL-27 em pacientes reumáticos.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Geral

Obter novos compostos derivados da tiazolidina-2,4-diona 3,5-dissubstituídos com potencial atividade biológica, a fim de contribuir com a pesquisa farmacêutica na busca de novos compostos candidatos a fármacos na terapêutica de doenças autoimunes.

2.1.2. Específicos

- Sintetizar novas moléculas das séries 5-benzilideno-3-(2-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ) e 5-benzilideno-3-(3-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ) através da modificação molecular, partindo de uma tiazolidina-2,4-diona;
- Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados por métodos espectrofotométricos, tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos compostos sintetizados, através da quantificação de citocinas por ELISA;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos compostos sintetizados através do protocolo experimental de air-pouch;
- Avaliar *in vitro* o papel da cloroquina e da hidroxicloroquina na produção de IL-17 e IL-22, em esplenócitos de camundongos BALB/c após estimulação com Con A;
- Avaliar *in vitro* o papel da cloroquina e da hidroxicloroquina na inibição da produção de citocinas da via Th17 em PBMCs provenientes de voluntários sadios após estimulação com PMA e Ionomicina;

- Investigar *in vitro* o papel da cloroquina e da hidroxicloroquina na inibição da produção de citocinas da via Th17 em PBMCs provenientes de pacientes portadores de LES e AR atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco;
- Correlacionar os níveis de IL-27 no soro de pacientes portadores de LES atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco com a atividade da doença (SLEDAI) e com o anti-DNA.

Justificativas

3. Justificativas

Apesar de existir um grande número de fármacos anti-inflamatórios amplamente utilizados na terapêutica, os graves efeitos colaterais ainda persistem. Portanto, é de fundamental importância desenvolver novos compostos que possibilitem a introdução de medicamentos mais eficazes e seguros. Com a redução dos efeitos adversos de novos fármacos, torna-se possível proporcionar uma melhor qualidade de vida aos indivíduos que fazem uso desta classe de medicamentos.

Dentre os compostos que já desempenham uma atividade terapêutica, destacam-se os derivados do núcleo tiazolidina-2,4-diona. Modificações estruturais no núcleo tiazolidínico podem originar compostos mais potentes e com baixos efeitos colaterais, que sejam ligantes ativadores do PPAR γ . Sendo estas modificações planejadas racionalmente há a possibilidade do surgimento de novas moléculas que possam revolucionar a terapêutica.

Ainda, a continuidade dos estudos dos efeitos do difosfato de cloroquina e do sulfato hidroxicloroquina sob a ação de citocinas pró-inflamatórias da via Th17 presentes de forma patogênica em doenças como LES e AR, podem contribuir para o desenvolvimento de imunoterapias mais específicas. Nesse contexto, os fármacos antimaláricos possibilitam alternativas de tratamentos mais eficazes.

Também é de fundamental importância a avaliação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias em indivíduos portadores de doenças autoimunes. O desenvolvimento de fármacos agonistas para citocinas que possuem papel anti-inflamatório, como a IL-27 em alguns estudos, possibilitam a introdução de novas terapias.

Revisão Bibliográfica

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Inflamação Crônica

Inflamação é um processo complexo que é manifestado por componentes celulares em resposta local de um tecido ao dano ou à infecção. O processo inflamatório foi caracterizado há mais de 2000 anos por quatro sinais de acordo com Celsus: rubor, edema, dor e calor (ZANINI e OGA, 1994; ROITT et al., 2003; OZDOL e MELLI, 2004;).

No estágio inicial da inflamação os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para os locais inflamados por meio da sinalização de moléculas produzidas por macrófagos. Essa resposta inicial a lesão tecidual é denominada reação inflamatória aguda. Diferentemente, quando a resolução da inflamação é desregulada, a tendência é a evolução para uma inflamação denominada de crônica. Nesta, há a predominância da ativação persistente de linfócitos e macrófagos que variam de morfologia. Os macrófagos com ativação persistente podem ocasionar contínuos danos teciduais e, desta forma, a evolução de uma inflamação crônica para uma neoplasia maligna (MANTOVANI e BALKWILL, 2001; LU et al., 2006).

4.2. Doenças Relacionadas com a Inflamação Crônica: Lúpus e Artrite Reumatoide

A resposta inflamatória crônica está presente em inúmeras enfermidades acarretando sérios impactos na qualidade de vida de pelo menos 70 a 100% dos indivíduos que a expressam (TSENG et al., 2006; SCHUBERT et al., 2007). Entre essas doenças que envolvem a inflamação crônica destacam-se as autoimunes como, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatoide (AR).

O LES é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de causa desconhecida e de natureza autoimune, caracterizada pela presença de diversos auto-anticorpos. O desenvolvimento da doença está ligado à predisposição genética e aos fatores ambientais, como luz ultravioleta e alguns medicamentos. Entre os sintomas mais

frequentes destacam-se a fotossensibilidade e o eritema malar (Figura 1) (RUS et al., 2002; CERVERA, 2006).



Figura 1. Eritema malar no LES (modificado de <http://www.drjeffchandler.com/2011/12/o-lupus-eritematoso-sistêmico-les.html>)

O tratamento do lúpus é individualizado para cada paciente e dependerá dos órgãos ou sistemas acometidos. Geralmente o tratamento é realizado com corticosteróides e imunossuppressores. Os especialistas também utilizam os antimaláricos, isolados ou em combinação. Entre esses medicamentos estão difosfato de cloroquina e o sulfato de hidroxicloroquina (HUGOSSON, BJORKMAN e BLOMBERG, 2002; COSTNER et al., 2003; SATO et al., 2006).

Outra doença de caráter inflamatório crônico é a AR que se manifesta pela inflamação aguda e crônica atingindo milhões de pessoas no mundo. Sua progressão é em geral associada a uma inflamação crônica de articulações de braço, perna e dedos. O tratamento não adequado pode desencadear a destruição de cartilagem e ossos e até paralisar o membro afetado. Dessa forma, o fator de morbidade é elevado piorando a qualidade de vida desses indivíduos (BEZERRA et al., 2001; MAZUMDER et al., 2003; BELIZÁRIO, 2006).

Assim, as doenças que envolvem o processo inflamatório se tornam alvo de grande interesse de solução. Os mecanismos que se encontram presentes na resposta

inflamatória são de grande atratividade para o desenvolvimento de novas drogas. Porém, os mecanismos que fazem parte da cascata inflamatória não estão totalmente elucidados (WILLOUGHBY et al., 2000).

4.3. Linfócitos T e Citocinas Envolvidas no Processo Inflamatório

Além de outros mecanismos, o processo inflamatório é determinado pela presença de leucócitos mononucleares, como os linfócitos T auxiliares (Th), e células apresentadoras de antígenos (APCs), como os macrófagos e células dendríticas. Essas células são sinalizadas por diferentes tipos de mediadores químicos. Entre esses mediadores se destacam a participação das citocinas durante a diferenciação das células T (OZDOL e MELLI, 2004; MAENG et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ naive em células T auxiliares efectoras é iniciada pelo engajamento dos receptores de células T e moléculas co-estimulatórias na presença de citocinas específicas produzidas pelo sistema imune inato ao encontro de patógenos específicos (LOCKSLEY, 2009; KORN et al., 2009). As células T CD4⁺ podem ser classificadas em subpopulações funcionais distintas baseadas no perfil de citocinas sintetizadas por elas mesmas (MOSMAN e COFFMAN, 1989). Dessa forma, destacam-se entre outros subtipos celulares as células Th1 e Th2 e as descritas mais recentemente, células Th17.

4.3.1. Vias Th1 e Th2

Classicamente, as células T CD4⁺ efectoras são subdivididas em dois subconjuntos, Th1 e Th2 (Figura 1), com base nas citocinas por elas secretadas (MOSMAN et al., 1986; ABBAS, MURPHY e SHER, 2002). As células Th2 são caracterizadas por produzirem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e desempenharem um importante papel na imunidade humoral na defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias (SHINKAI et al., 2002; MIN et al., 2004). As células Th1 efectoras são responsáveis por regular a imunidade contra infecções intracelulares. Durante a imunidade inata e adaptativa as células Th1 são

ativadas e secretam uma larga quantidade de citocinas como IL-2 ou IFN- γ , IL-12 ou IL-18 (ROMAGNANI, 2004).

A citocina pró-inflamatória IFN- γ é responsável pela regulação de mais de 30 genes e, assim, por uma variedade de respostas fisiológicas e celulares como, por exemplo a indução de espécies reativas de oxigênio que são produzidas por macrófagos e outras células (NATHAN et al., 1983). Além disso, o IFN- γ é uma citocina pleiotrópica que é importante na regulação dos processos imunes e inflamatórios crônicos devido à sua participação na ativação de fatores de transcrição como κ B (NF- κ B) (FARRAR e SCHREIBER, 1993; CHESHIRE e BALDWIN JR, 1997; ASEHNOUNE et al., 2004; AGGARWAL, 2004). Ainda, os estudos atribuem os altos níveis de IFN- γ em pacientes asmáticos e esta citocina como um possível alvo no tratamento da asma crônica (CORRIGAN e KAY, 1990; HACKEN et al., 1998; KUMAR et al., 2006).

4.3.2. Via Th17

Por muitos anos, pensava-se que as células T CD4⁺ naive se diferenciavam em duas linhagens celulares: as células Th1 e Th2. No entanto, o conhecimento sobre as células T CD4⁺ nas respostas imunes adaptativas se tornou mais abrangente. Um novo subconjunto de células T auxiliares, chamadas células Th17 (Figura 1), tem sido descrito. Essas células são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (PARK et al, 2005; MCGEACHY CUA e 2008; LIANG et al, 2006; LANGRISH et al, 2005; CHUNG et al, 2006). Assim como as células Th1 e Th2, o desenvolvimento de células Th17 naive em células T efectoras é dependente da apresentação de antígenos por APCs e moléculas co-estimulatórias. As citocinas IL-1 β , IL-6, TGF β são relatadas por sinalizar a indução do desenvolvimento das células Th17 (VELDHOEN et al, 2006; MANGAN et al, 2006; BETTELLI et al, 2006). Outros estudos demonstram a interleucina 23 (IL-23) como responsável pela manutenção da via das células Th17 (KORN et al, 2009; HUE et al, 2006).

Os dados sugerem que as células Th17 desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra bactérias e fungos extracelulares. No entanto, os estudos tem demonstrado que essas células participam ativamente na patogênese de doenças auto-

imunes. Anteriormente, acreditava-se que essas funções eram apenas mediadas por células das vias Th1 e Th2 (FRANK et al. , 2009; IWAKURA et al, 2011).

Ainda, tornou-se evidente que as respostas da via Th17 estão associadas com a inflamação crônica presentes no LES e AR (OUYANG, KOLLS e ZHENG, 2008; CRISPIN e TSOKOS, 2009). Indivíduos com LES possuem uma produção aumentada de IL-17 amplificando as resposta imunes nos órgãos e aumento da produção de anticorpos pelas células B (CRISPIN e TSOKOS, 2010). Ainda, IL-17A e IL-22 contribuem para a patogênese da AR, como tem sido demonstrado em vários modelos experimentais de artrite (LUBBERTS, 2010). Além disso, as evidências demonstram que, o avanço no conhecimento das funções patogênicas da via Th17 em doenças auto-imunes, permitem estratégias de bloqueio específicos podendo fornecer uma próxima geração de terapias eficazes (HU et al., 2011).

4.3.3. Regulação das Vias Th1, Th2 e Th17: IL-27 como uma citocina anti-inflamatória

Interleucina 27 (IL-27) é um membro da família das interleucinas IL-6 e IL-12, fazendo parte de um grupo que é fundamental em processos biológicos como o crescimento neuronal, a manutenção óssea, desenvolvimento cardíaco e regulação imune. IL-27 é constituída por um complexo de receptor IL-27R (também chamado WSX-1) e pela glicoproteína 130 (gp130). Ambos os componentes foram encontrados co-expressos em uma ampla gama de células imunes, incluindo monócitos, células B e células T (VILLARINO et al., 2006; YOSHIDA, NAKAYA e MIYAZAKI, 2009).

O papel da IL-27 na resposta imune não é totalmente compreendido desde que respostas pró e anti-inflamatórias já foram descritas. Alguns estudos relatam que a IL-27 poderia promover citocinas da via Th1, como IFN γ . Além disso, IL-27 parece induzir a fosforilação de STAT-4, uma via de sinalização de células Th1 efectoras (LUCAS, GHILARDI e DE SAUVAGE, 2003).

No entanto, há evidências que WSX-1 pode inibir o processo inflamatório através da produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, por células CD4⁺, via STAT-1 e

STAT-3 (STUMHOFER et al., 2006). Além disso, estudos mostram que IL-27 suprime citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-6 e IL-17 (BATTEN e GHILARDI, 2007).

Um estudo demonstrou que a produção de IL-17, por células Th17, foi reduzida devido à presença de IL-27. A correlação foi feita com camundongos deficientes de IL-27R onde ocorreu maior frequência da produção de células Th17 em presença de TGF β e IL-6 (BETTELLI et al., 2006; STUMHOFER et al., 2006).

Em adição, foi demonstrado que a IL-27 previne a geração de células Th17 através da inibição de ROR γ t, gene promotor desta linhagem celular. Nas inflamações crônicas, IL-27 é secretada para suprimir células Th17 através da regulação de IL-17A e a indução de IL-10 (DIVEU et al., 2009).

Estes resultados que mostram a IL-27 atuando como uma citocina anti-inflamatória podem ter implicações para uma ampla gama de patologias imunomediadas. O tratamento com IL-27 pode proporcionar uma alternativa para a supressão de citocinas pró-inflamatórias em doenças crônicas.

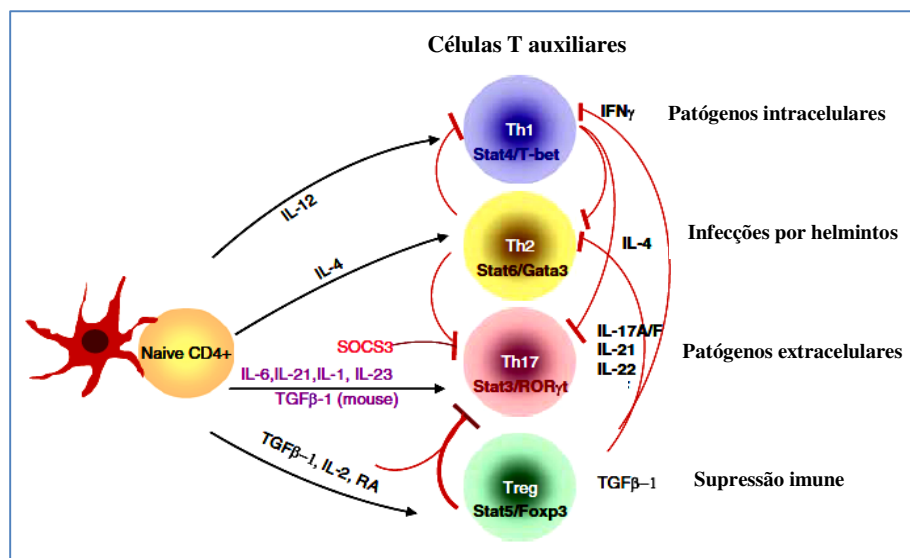


Figura 2. Citocinas envolvidas na diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ (modificado de: Chen e Shea, 2008).

4.4. Anti-inflamatórios Utilizados na Terapêutica das Doenças Auto-imunes

Apesar de a inflamação ser um processo importante envolvido na defesa do organismo, frequentemente está presente em estímulos dolorosos e crônicos havendo a necessidade de intervenção terapêutica.

Para o tratamento das doenças inflamatórias crônicas são utilizados vários grupos de medicamentos anti-inflamatórios. Entre eles destacam-se os glicocorticóides que exercem os mais potentes efeitos anti-inflamatórios que comprometem o sistema imune quando a terapia é crônica (DAMIANI et al., 1984) e os antimaláricos, visto que são utilizados na prática clínica para o tratamento do LES e da AR (BORBA et al., 2008; SMOLEN et al., 2010) em associação ou não com outros medicamentos.

4.4.1. Glicocorticoides

Os glicocorticoides constituem-se em um grupo de drogas muito usadas em medicina clínica. Em virtude de seu amplo espectro de atividade encontram uso praticamente em todas as especialidades médicas (DAMIANI et al., 1984). São os mais potentes fármacos anti-inflamatórios, pois possuem a capacidade de inibir todos os componentes envolvidos no processo inflamatório (GREAVES, 1976).

No entanto, por terem capacidade de atravessar livremente as membranas celulares esse grupo de medicamentos provoca, em todos os tipos de tecidos, os mais diversos e graves efeitos colaterais (CARVALHO, DIAS e CANEIRO, 2004; ALHEIRA e BRASIL, 2005). Entre esses efeitos destacam-se diabetes mellitus, úlcera péptica, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma e síndrome de Cushing com supressão do eixo hipotálamo-hipófiseadrenal (SCHAKE et al., 2004).

Entre os glicocorticoides utilizados na terapêutica estão: a prednisona (Figura 3A), metilprednisolona (Figura 3B), dexametasona, betametasona e cortisona (GILMAN et al., 2003; RANG et al., 2004)

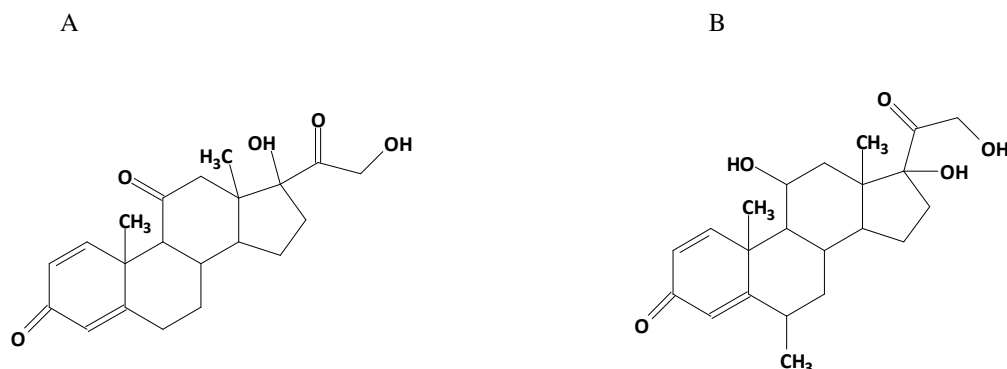


Figura 3. Estrutura da prednisolona (A) e metilprednisolona (B)

4.4.2. Antimaláricos: Desenvolvimento, Propriedades e Mecanismo de Ação

A síntese da cloroquina foi originada a partir de um trabalho de Paul Ehrlich, com a utilização do azul de metileno, um corante sintético. Foi observado que esse corante era seletivamente absorvido pelo parasita causador da malária, o *Plasmodium falciparum*. Em seguida, o azul de metileno foi substituído por um análogo, onde a substituição de um grupo metilênico por um grupo básico melhorava a atividade contra o parasita (GREENWOOD, 1995; SOLOMON e LEE, 2009).

Em 1925, surgiu o pamaquino, que posteriormente foi substituído pelo mepacrino, um composto acridínico que levou à descoberta de dois compostos: o sontoquino e o SN 3294. Os estudos sobre esses dois compostos resultaram na descoberta do Resochim, que foi ignorado por uma década devido a sua duvidosa toxicidade em uso clínico. Porém, as propriedades toxicológicas foram reavaliadas e descobriu-se sua tolerância para seres humanos. Com esses resultados o Resochim foi introduzido no mercado com o nome de cloroquina (CQ) (Figura 4A) assim como o seu análogo, a hidoxicloroquina (HCQ) (Figura 4B) (STOCKS et al., 2001; SCHLITZER, 2007).

Desde a sua introdução na prática clínica, em 1947, a CQ ainda continua a ser o fármaco de escolha para o tratamento e profilaxia da malária devido à sua eficácia e elevada tolerância em humanos (WIESNER et al., 2003; SASAKI et al., 2010).

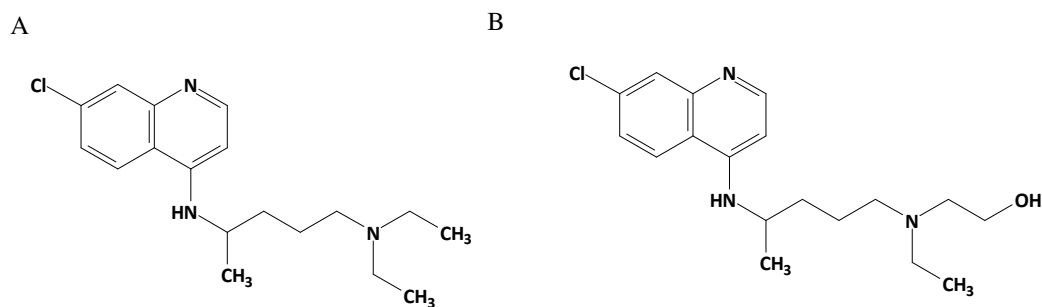


Figura 4. Estrutura da cloroquina (A) e da hidroxiclороquina (B)

Em geral, a CQ é preparada como sal de difosfato de N'-(7-cloroquinolin-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina, possuindo propriedades de base fraca e atuando de forma lisossomotrópica e anti-autofágica (BORGONOVO et al., 2002; ZHAO et al., 2005). Devido à sua propriedade de base fraca e de natureza lipossolúvel a CQ atravessa facilmente membranas de organelas como os lisossomos e endossomos. Nessas organelas o pH é baixo permitindo, com isso, a forma protonada e o acúmulo da CQ (WEBER, CHEN e LEVITZ, 2002). A CQ possui a capacidade de inibir a formação de vesículas ácidas, que constituem predominantemente na formação de fagossomos e lisossomos no citoplasma, impedindo, dessa forma, o processo autofágico. Além disso, devido a sua alta capacidade de dificultar processos proteolíticos, o acúmulo do difosfato de cloroquina no interior de lisossomos resulta na inibição de enzimas como a fosfolipase A2 provocando, dessa forma, alterações no metabolismo de lipídios e nas diversas vias de sinalizações celulares (NOSAL e JANCINOVA, 2002; YIN et al., 2003).

Essas propriedades, provavelmente são responsáveis por diversos efeitos biológicos da CQ e da HCQ como, por exemplo, os anti-inflamatórios (AMARAVADI et al., 2007; TASDEMIR et al., 2008).

4.4.2.1. Atividade Anti-inflamatória da Cloroquina e Hidroxiclороquina

Entre os primeiros estudos, a CQ é sugerida como um possível agente anti-inflamatório para o tratamento de doenças autoimunes. Em 1966, Cowey e Whitehouse,

discutem a CQ e o mepacrino como inibidores de enzimas proteolíticas e sugerem utilização desses fármacos em doenças como a artrite degenerativa.

Ainda, Rynes em 1988, destaca estudos com placebo e a eficácia da HCQ no tratamento da AR. Esses estudos ilustram a importância do tratamento periódico com a HCQ em doenças reumáticas evidenciando excelentes respostas.

Desde então, diversos estudos relatam a ação anti-inflamatória desses fármacos por participarem da modulação de citocinas pró-inflamatória como IFN γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Picot e colaboradores, 1993, realizaram um estudo com a CQ em macrófagos estimulados com LPS e sobrenadantes de cultura do *P. falciparum*. Os níveis de TNF- α e IL-6 foram relativamente menores para as amostras de sobrenadante expostas à CQ.

Em 1997, Van der Bone e colaboradores, avaliaram a eficácia da CQ e da HCQ em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), na produção de IFN γ , IL-6 e TNF- α . Observaram que este composto é capaz de inibir a produção de TNF- α e IL-6 em células estimuladas com LPS. No entanto, nas células que foram estimuladas com PHA foi observada apenas a inibição da produção de TNF- α e IFN γ .

Karrens e colaboradores (1998) analisaram o efeito de diferentes concentrações da CQ em PBMC de voluntários sadios utilizando como estímulo LPS. Observaram uma significativa redução da síntese, assim como o efeito dose-dependente da CQ sob a secreção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β associada à expressão de mRNA pelo método de Northern blotting.

Um estudo semelhante foi realizado por Jang, Choi e Jue, em 2006, para avaliar o efeito da CQ em células das linhagens U-937 e THP-1, monócitos e macrófagos, e PBMC de voluntários sadios estimuladas com LPS. Os resultados demonstraram a inibição da síntese de IL-1 β , IL-6 e TNF- α como também a redução dos níveis de mRNA. Os autores sugerem que um melhor entendimento sobre os efeitos da CQ na produção de citocinas pró-inflamatórias podem possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças autoimunes.

Jeong et al., 2002, baseados em seus resultados com células U-937 e monócitos humanos estimuladas com PMA, sugeriram que a CQ, além de inibir a síntese de TNF- α

também participa da regulação de receptores de superfície celular de TNF retardando seu transporte para a superfície da célula. Substâncias com propriedades semelhantes as da CQ como o cloreto de amônio e a HCQ demonstraram similaridade nos resultados obtidos.

Um grupo de estudos constituído por 25 pacientes com LES foram tratados por três meses com CQ, na dose de 125 mg duas vezes ao dia, com o objetivo de avaliar os níveis séricos de IL-1 β , TNF- α , IL-18 e IL-6. Os resultados demonstraram que nos paciente tratados, os níveis das citocinas e de eritema foram significativamente menores que o grupo controle (WOZNIACKA et al., 2006).

Além da inibição de citocinas inflamatórias, alguns trabalhos enfatizam os efeitos fotoprotetores da monoterapia com CQ em pacientes com LES.

De fato estudos mostram os efeitos fotoprotetores da CQ, Wozniacka e colaboradores (2008), determinaram os níveis de mRNA por RT-PCR para IL-1 β , IL-6 e TNF α em biópsias de pele de pacientes com LES 24 horas após irradiação antes e após 3 meses de tratamento. Observaram que nos locais irradiados, a expressão dos três níveis de mRNA foram maiores que no grupo não irradiado antes do tratamento com CQ. A expressão dos níveis de mRNA foram significativamente mais baixos após 3 meses de tratamento com cloroquina para os paciente que receberam irradiação. Dessa forma, os autores demonstraram os efeitos inibitórios locais da cloroquina sobre raios UVB induzidos sugerindo dados adicionais para os efeitos imunomoduladores da cloroquina.

Ainda, os antimaláricos permanecem sendo o tratamento de primeira linha para pacientes com LES com baixa atividade da doença junto com os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais. A hidroxicloroquina, por exemplo, é eficaz na terapia e prevenção quando se trata das manifestações leves em pacientes com lúpus. Porém, é ineficaz na prevenção das manifestações clínicas graves (TORUNER e DIAMOND, 2011).

Nesse contexto, os estudos dos efeitos da cloroquina e seu análogo merece continuidade. Diversos estudos realizados direcionam a ação da cloroquina a um número restrito de número de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Recentemente, outras citocinas estão sendo pesquisadas, visto que participam ativamente de maneira agravante ou não na expressão de diversas doenças como o LES e AR. Entre essas, citocinas

destacam-se a IL-17, IL-22 e IL-27. Estudos sobre o efeito da CQ e HCQ sob a ação dessas citocinas podem contribuir para um melhor entendimento imunomodulador desses fármacos.

4.5. Desenvolvimento de Novos Fármacos Anti-inflamatórios

Apesar do grande número de medicamentos já existentes no tratamento de doenças crônicas, os efeitos colaterais ainda prevalecem. Dessa forma, há limitações no uso de anti-inflamatórios havendo uma grande necessidade para descoberta de novos compostos. A química medicinal tem como uma de suas atribuições a descoberta de novos fármacos descrevendo a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica. O planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias possuem propriedades capazes de representarem novas entidades químicas, candidatas a protótipos de novos fármacos de uso seguro (BARREIRO et al., 2002).

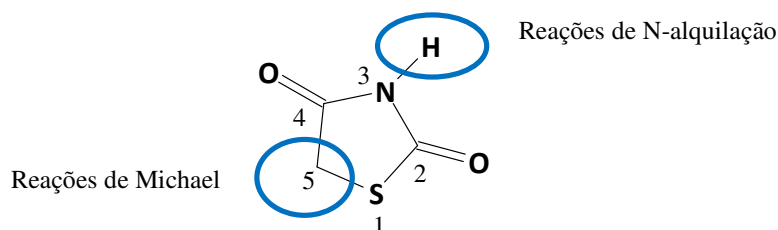
O desenvolvimento da química orgânica moderna forneceu um grande número de substâncias com vários alvos terapêuticos. Entre os métodos mais frequentes utilizados para o desenvolvimento de novas drogas, encontram-se a modificação molecular ou o chamado bioisosterismo de protótipos. Esta estratégia está baseada na substituição de grupos em determinadas posições desses protótipos originando compostos similares com atividades biológicas semelhantes (KOROKOLVAS, 1977 *apud* SILVA et al., 2003).

Estudos *in vitro* comprovam a relação dos anéis heterocíclicos como potentes protótipos de novas moléculas com atividade anti-inflamatória. A importância dos heterocíclicos é incontestável, particularmente no que diz respeito ao fato de inúmeros usos como medicamentos (LEVAL et al., 2000; MELO, 2006).

Diversos compostos sintéticos são obtidos a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre as quais, destaca-se o núcleo tiazolidínico devido à sua potencialidade como bioprotótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

4.5.1. Reatividade do Núcleo Tiazolidina-2,4-diona

O núcleo tiazolidínico apresenta uma expressiva reatividade química possibilitando a introdução de inúmeros substituinte sendo, dessa forma, um protótipo alternativo para o desenvolvimento de novos compostos. Dentre as diversas reações que envolvem o anel tiazolidínico são mais relatados na literatura os processos quimiosseletivos que ocorrem em posição 3 em reações de N-alquilação (GRACIET et al., 1996) e as reações que ocorrem no carbono metilênico em posição 5 com compostos carbonílicos (Esquema 1) (VICINI et al., 2006).

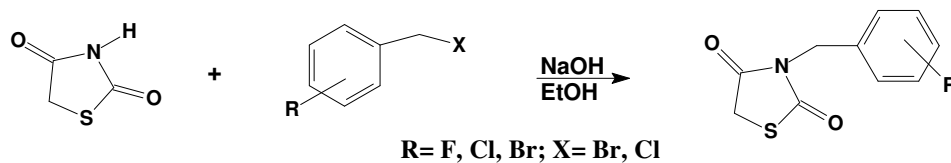


Esquema 1. Reações que ocorrem na posição 3 e 5 do núcleo tiazolidina-2,4-diona

As reações que ocorrem na posição 3 são de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2). As tiazolidinas-2,4-dionas comportam-se como ácidos fracos quando não são substituídas em posição 3. Dessa forma, são solúveis em soluções básicas possibilitando a formação de sais que reagem com haletos de alquila (LIMA, 1998).

As substituições nucleofílicas do núcleo tiazolidínico podem ser obtidas diferenciando apenas no meio alcalino como hidróxido de potássio em etanol (LO et al., 1953), hidróxido de sódio em etanol (DAVIS e DAINS, 1935) e sódio em metanol (BRADSHER et al., 1956). Esses métodos podem ser exemplificados por compostos sintetizados por diversos autores. Entre eles:

Lima e colaboradores (1992) e Costa e colaboradores (1995) sintetizaram compostos tiazolidínicos 3-substituídos através de substituições nucleofílicas utilizando como meio básico hidróxido de sódio em etanol (Esquema 2).



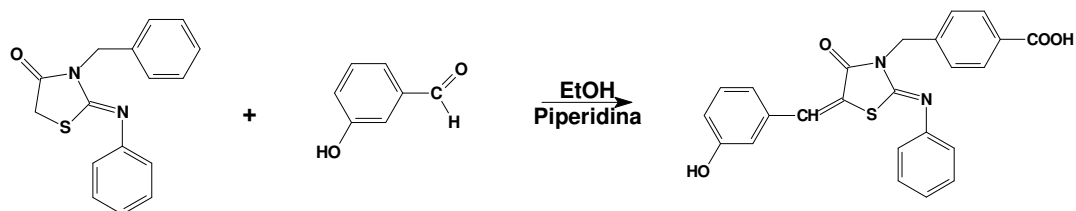
Esquema 2. Derivados tiazolidínicos 3-substituídos obtidos com NaOH em etanol

Contudo, alguns autores na síntese de seus compostos tem utilizado outros métodos de substituições em posição 3 do núcleo tiazolidina-2,4-diona diferenciando o meio básico e o tipo de solvente utilizados como, por exemplo, hidreto de sódio em dimetilformamida (DMF) ou tetrahidrofurano (THF) (BRUNO et al., 2002; BOZDAG-DUNDAR et al., 2008) e carbonato de potássio em acetona ou dimetilformamida (MACCARI et al., 2007; CHANDRAPPA et al., 2008).

Um dos métodos mais utilizados e explorados para formação de ligações carbono-carbono na química orgânica sintética são as reações de condensação de Knoevenagel. Esse método consiste no tratamento de compostos carbonílicos com um composto metilênico ativo na presença de uma base ou ácido catalítico, onde haverá a formação de água no decorrer do sistema reacional (TROST, 1991).

O grupo metilênico da posição 5 do núcleo da tiazolidina, devido a sua acidez, possui reatividade característica e condensa com aldeídos ou cetonas em reações de Knoevenagel. Primeiramente há a ionização do grupo metileno em presença de uma base e, em seguida, o enolato formado se adiciona à carbonila do aldeído havendo posterior desidratação do álcool (LIMA, 1998; LIESSEN et al., 2008).

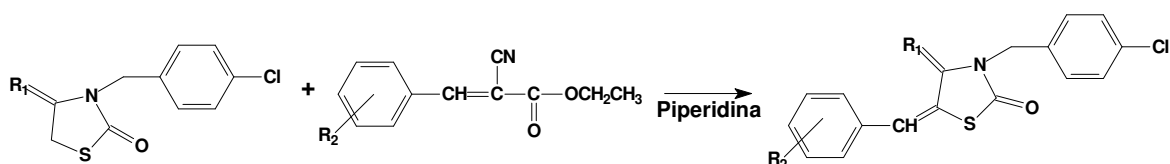
Ottanà e colaboradores (2009) sintetizaram o derivado 4-{[5-(3-hidroxibenzilideno)-4-oxo-2-feniliminothiazolidin-3-il]metil}benzoicacid obtendo rendimento maior que 60% utilizando o aldeído apropriado, piperidina como catalizador e etanol como solvente que pode exemplificar a reação de Knoevenagel na posição 5 do núcleo tiazolidínico (Esquema 3).



Esquema 3. Reação de Knoevenagel na posição 5 do núcleo tiazolidina-2,4-diona

No entanto, na posição 5 do núcleo tiazolidínico também podem ocorrer reações de adição de Michael com ésteres 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila (LPSF/GPIT/IP) substituídos originando compostos benzilidênicos (PITTA et al., 2003). Na obtenção desses compostos há formação de um carbânion na posição 5 do núcleo tiazolidínico seguido do ataque ao carbono β do éster cianocinâmico.

Santos e colaboradores (2005) realizaram a síntese de derivados tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos utilizando ésteres 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila. Os compostos foram obtidos com rendimentos entre 70 e 82% sugerindo, dessa forma, uma boa rota sintética de obtenção (Esquema 4).



Esquema 4. Compostos 3,5-dissubstituídos obtidos com acrilatos de etila

Os acrilatos de etila, por sua vez, são obtidos por reações de Knoevenagel, onde aldeídos aromáticos reagem com cianoacetato de etila na presença de piperidina, como catalisador, em solução benzênica ou de tolueno (COPE et al., 1941; ZABICKY, 1961).

Dessa forma, a expressiva reatividade química apresentada pelo núcleo tiazolidínico nas posições 3 e 5 possibilita a introdução de inúmeros substituintes

representando, nesse contexto, um protótipo alternativo para o desenvolvimento de novos fármacos.

4.5.2. Atividade Anti-inflamatória dos PPAR γ

Receptores nucleares são membros de uma numerosa família de fatores de transcrição que regulam diversos aspectos biológicos. Entre esses receptores, merece destaque os ativadores de proliferação peroxissomal (PPARs) que são pontos-chaves em na catalização e coordenação de diferentes eventos bioquímicos, como a regulação da insulina. Três tipos de PPARs foram identificados: PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ (KOTA et al., 2005; RIZZO e FIORUCCI, 2006; TOUYZ e SCHIFFRIN, 2006).

No entanto, o papel mais importante dos três tipos de PPARs tem sido expressado no sistema imune podendo ter atividade adicional na resposta imunológica. Os PPARs ultimamente têm sido reportados na regulação da resposta inflamatória. Em particular, os PPAR γ que, por meio da sua ativação, tiveram atividade anti-inflamatória em diversos sistemas de modelos de animais, sendo sugeridos como potentes agentes terapêuticos na reversão da inflamação (MORAES et al., 2006; LEE et al., 2007).

Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando ligantes sintéticos de PPAR γ mostraram alta inibição de mediadores pró-inflamatórios. De acordo com Lee e colaboradores (2006), o PPAR γ participa da síntese e imunoregulação de citocinas secretadas por vários tipos celulares (EUN et al., 2006; KAPOOR et al., 2007). A inibição de citocinas ocorre pela via da I κ B, uma vez que o PPAR γ inibe a degradação da enzima, responsável pela translocação do NF- κ B para o núcleo celular (LINTON e FAZIO, 2004; LAPPAS et al., 2007; LITTLE et al., 2007; STIENSTRA et al., 2007).

Ainda, já existem estudos na literatura que demonstram os PPAR γ como mediador da inibição das respostas de células T auxiliares e como um dos reguladores transcricionais envolvidos na diferenciação de células Th17 (CLARK et al., 2000; HWANG, 2010).

Um trabalho realizado por Klotz e colaboradores (2009), demonstrou que o PPAR γ participa de forma intrínseca na inibição seletiva da diferenciação das células Th17, uma vez que suprimiu seu gene promotor, o ROR γ t. Os autores também sugerem

que o PPAR γ representa um alvo molecular promissor na imuno-intervenção específica, por meio da inibição de células Th17, em doenças autoimunes, como a esclerose múltipla.

4.5.2.1. Atividade Anti-inflamatória das Tiazolidinas-2,4-dionas como Ativadoras de PPAR γ

Na década de 1990, o alvo molecular das estruturas contendo o núcleo tiazolidina-2,4-diona foi esclarecido mostrando ter ações farmacológicas como ligantes ativadores de PPAR γ . A primeira tiazolidina-2,4-diona, a troglitazona (Rezulin[®])(Figura 5A), foi sintetizada em 1995 e retirada do mercado devido a alta toxicidade que exibia. Entre 1997 e 1999, duas novas tiazolidinas foram aprovadas: a pioglitazona (Actos[®])(Figura 5B) e a rosiglitazona (Avandia[®])(Figura 5C) para o tratamento da diabetes tipo 2. Desde então um largo número de drogas tiazolidínicas têm sido sintetizadas e estudadas clinicamente (KIM et al., 2007).

Esses agentes farmacológicos atuam na regulação do metabolismo de lipídios assim como têm ação hipoglicemiante. Entretanto, os compostos tiazolidínicos são reportados como influentes na regulação da inflamação e seus efeitos anti-inflamatórios podem contribuir para a redução dos efeitos colaterais (BUCKINGHAM, 2005; WIJK et al., 2006; KUREBAYSHI et al., 2005; GONZALEZ et al., 2007).

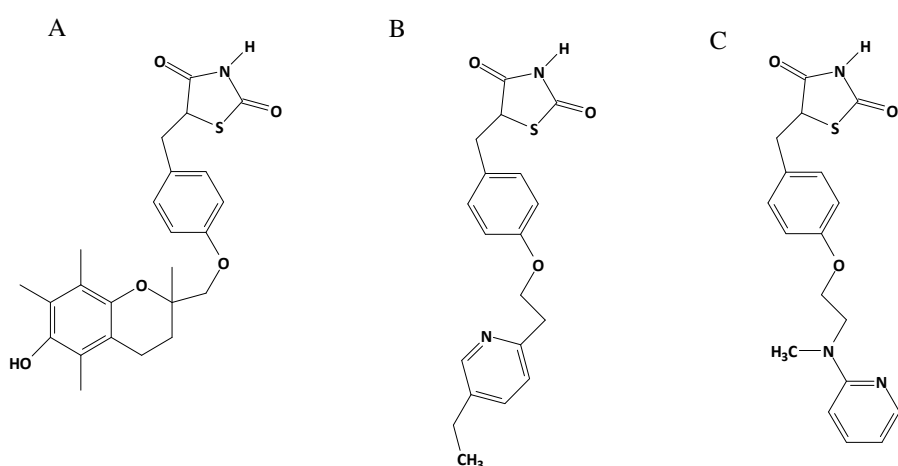


Figura 5. Estrutura da troglitazona (A), pioglitazona (B) e rosiglitazona (C)

Os efeitos anti-inflamatórios das tiazolidinas-2,4-dionas são revelados pela ativação de PPAR γ que modulam mediadores inflamatórios através da inativação de NF- κ B. Além do potente efeito anti-inflamatório desses receptores nucleares, é válido ressaltar seu efeito protetor em condições patofisiológicas, como o câncer (SUNG et al., 2006; GHOSE et al., 2007).

Um estudo realizado por Liu e colaboradores (2005), demonstrou o efeito anti-inflamatório da rosiglitazona e da pioglitazona pelo mecanismo de ativação de PPAR γ inibindo a indução de TNF- α . Outro estudo foi realizado por Rollins e colaboradores (2006), que avaliaram o papel do PPAR γ na regulação da inflamação da pancreatite aguda. A tiazolidinona utilizada foi a troglitazona em um modelo de pancreatite aguda usado em camundongos. Os resultados demonstraram sugestões com agonistas de PPARs como potentes terapias de prevenção e tratamento de pancreatites na forma aguda.

Ainda, foi efetivado por Crosby e colaboradores (2005) um estudo com um agonista sintético do PPAR γ , a ciglitazona (Figura 6), onde este reduziu a expressão de mediadores inflamatórios, como NO.

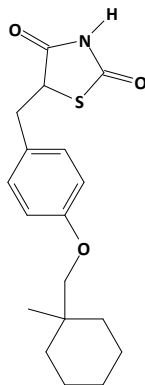


Figura 6. Estrutura da ciglitazona

De acordo com Jeong e colaboradores (2002) as sínteses e as atividades biológicas das tiazolidinonas têm sido extensivamente revistas sendo apontadas como potentes inibidores enzimáticos com amplas aplicações terapêuticas. Os mesmos autores

realizaram a síntese de novos compostos benzilidênicos derivados da tiazolidina-2,4-diona que apresentaram atividade ativadora de PPAR γ .

4.5.3. Bioatividade dos Compostos Tiazolidínicos

As tiazolidinas-2,4-dionas são o objetivo de extensas pesquisas devido ao seu envolvimento profundo na regulação de diferentes processos fisiológicos. Diversos estudos revelam que esses compostos que possuem o núcleo tiazolidínico representam uma grande importância na descoberta de drogas. As literaturas mais recentes indicam esses compostos com diversas atividades e aplicações terapêuticas (BARROS-GARCIA et al., 2004).

São apontadas como portadoras de significativas atividades antidiabética, (MOURÃO et al., 2005); antimicrobiano (GOUVEIA et al., 2008), anti-chagásica (DU et al., 2002; COHEN et al., 2004), antitumoral (CHANDRAPPA et al., 2008) anti-HIV (RAWAL et al., 2007) e anti-inflamatória (UCHOA et al., 2009).

Cho e colaboradores, em 2005, sintetizaram o 5-(3,5-*diterc*-butil-4-hidroxibenzilideno) tiazolidina-2,4-diona (BTZD) e sugeriram como um possível fármaco anti-inflamatório.

Zarghi e colaboradores (2007) sintetizaram derivados 2,3-diaril-1,3-tiazolidina-4-ona (Figura 7) contendo o grupo farmacóforo metilsulfonil que demonstraram atividade inibitória da COX-2.

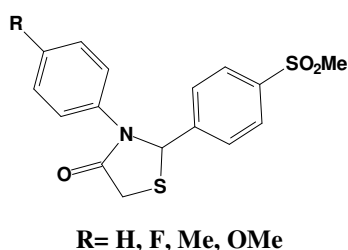


Figura 7. Derivados 2,3-diaril-1,3-tiazolidina-4-ona

Ali e colaboradores (2007), sintetizaram tiazolidinas-2,4-dionas 3,5-dissubstituídas com átomos de cloro e bromo em posição orto do anel benzilidênico e

concluíram que esses compostos apresentaram promissora atividade anti-inflamatória e analgésica. (Figura 8). Ainda, sugestionaram que o grupamento metílico em posição *para* contribuiu do anel positivamente para a inibição de mediadores inflamatórios.

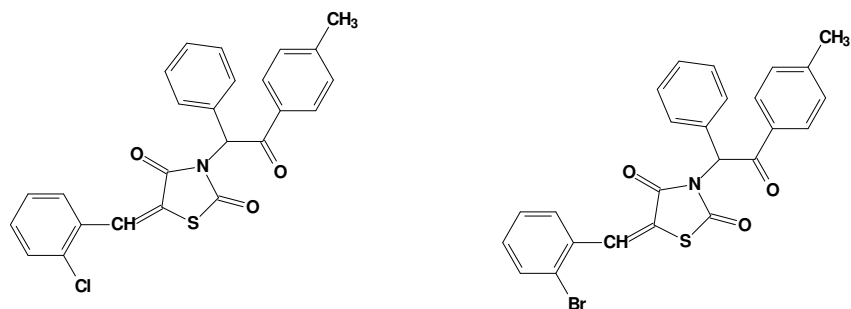


Figura 8. Compostos tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos sintetizados por Ali et al., 2007.

O derivado AS605240 (Figura 9), que possui o núcleo tiazolidínico substituído em posição 5, foi demonstrado por prevenir doenças inflamatórias crônicas em diversos modelos animais como modelos de AR, LES e arterosclrose (BARBER et al., 2005; CAMPS et al., 2005; FOUGERAT et al., 2008).

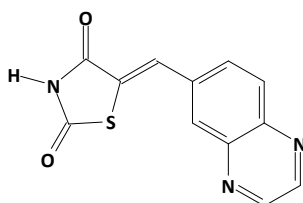


Figura 9. Estrutura do derivado AS605240

Peng e colaboradores (2010) avaliaram o potencial terapêutico do AS605240 em um modelo animal de colite crônica. Obtiveram como resultado a inibição da indução da colite associada à imunossupressão de citocinas como o IFN γ . O trabalho também sugere que este composto representa um agente promissor para o tratamento de doenças intestinais crônicas devido ao seu poder imunoregulador perante a inibição de citocinas inflamatórias.

Pesquisas realizadas no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/GPIT/UFPE) também sintetizaram e avaliaram o potencial anti-inflamatório de algumas tiazolidinas substituídas em posição 3 e 5. O principal método obtenção utilizado na obtenção desses compostos consistiu em reações de N-alkilação, na presença hidróxido de sódio ou potássio em etanol; e reações de Michael com ésteres de COPE na presença de piperidina, como catalizador. Dentre os derivados destacamos:

Lima e colaboradores, em 1998, sintetizaram e avaliaram a atividade analgésica de derivados da série 3-fenacil-tiazolidina-2,4-diona. Dentre os resultados obtidos pelo autor o derivado 3-(4-fenil-fenacil)-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/HQ) demonstrou atividade analgésica na dose de 250 mg/kg (v.o.), em ratos (Figura 10).

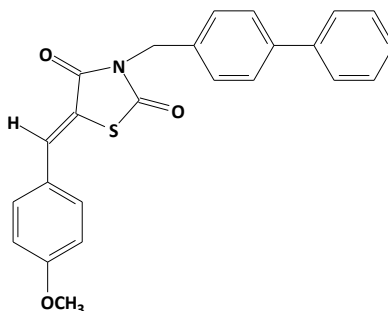


Figura 10. Derivado LPSF/HQ com atividade analgésica

Santos e colaboradores (2005) efetivaram com sucesso a síntese e a atividade anti-inflamatória de novas tiazolidinas-2,4-dionas e 4-tioxotiazolidinonas (Figura 11).

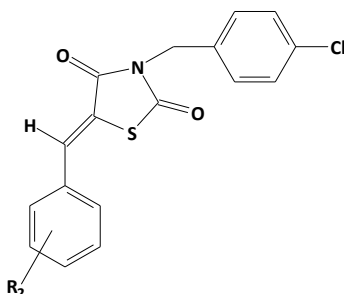


Figura 11. Tiazolidinas sintetizadas por Santos e colaboradores em 2005

O potencial das tiazolidinadionas como agentes hipoglicemiantes descrito na literatura conduziu Mourão e colaboradores (2005) para realização da síntese e avaliação quanto a sua ação anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipidêmica de novos análogos da série 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona. O derivado 5-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ) exibiu redução de 50% no nível da glicose plasmática e triglicerídeos em modelos experimentais de camundongos diabéticos induzidos por aloxano (Figura 12) (Pitta et al., Br, IP-0300997-1, 2003).

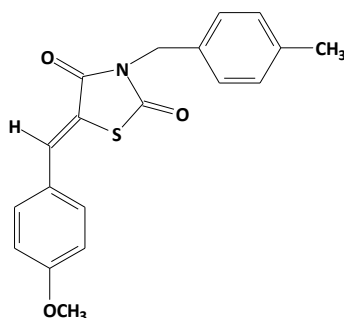


Figura 12. 5-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona

Ainda, compostos da série 5-benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF) foram sintetizados e avaliados biologicamente exibindo considerada ação anti-inflamatória. Dentre ele, o derivado 5-(4-metil-sulfonil-benzilideno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-23) se destacou, visto que ação anti-inflamatória investigada no modelo de bolsão de ar induzido por carragenina reduziu em 60% a migração de leucócitos para o local da inflamação (Figura 13) (COUTO, 2006).

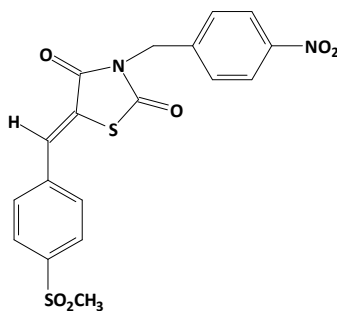


Figura 13. Derivado LPSF/SF-23

Em um estudo realizado por Leite e colaboradores (2007), foi comprovado o alvo biológico do derivado 5-(4-hidróxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidínico (LPSF/GQ) (Figura 14A). Os resultados demonstraram que o composto apresenta-se como agonista do PPAR- γ (Figura 14B).

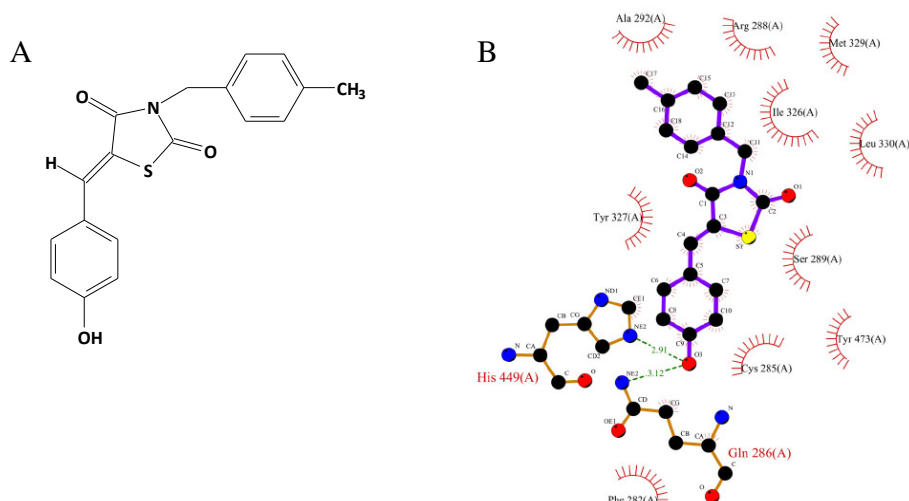


Figura 14. LPSF/GQ (A) como agonista do PPAR γ (B)

Pereira e colaboradores (2007) realizaram um estudo de investigação do “docking” do derivado 5-(2-bromo-benzilideno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-13) (Figura 15A) utilizando como alvo a estrutura do PPAR γ (Figura 15B). Como resultado, observou-se que o derivado encontra-se sobreposto a rosiglitazona formando ligações com os aminoácidos His449, Gln286 e Tyr473. Ainda, foi realizada pelo autor a avaliação antiinflamatória *in vivo* do derivado LPSF/SF-13 pelo método de “air-pouch” induzido por carragenina apresentado 68% de inibição da migração leucocitária.

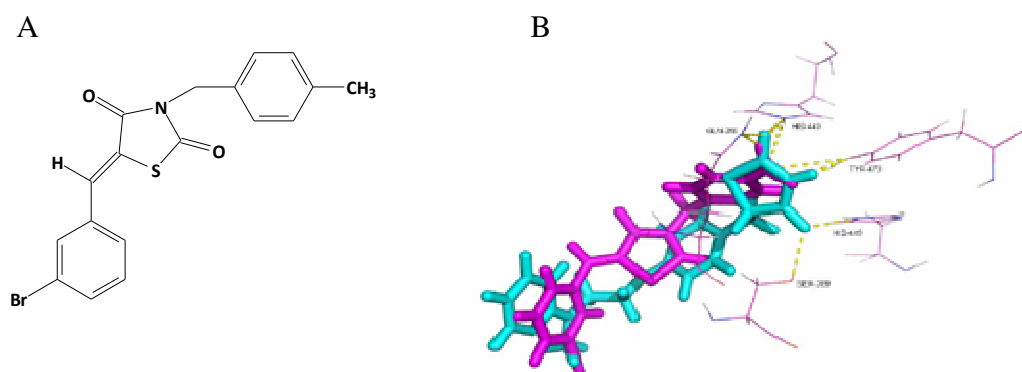


Figura 15. LPSF/SF-13 (A) (roxo) sobreposto a rosiglitazona (azul) no estudo de “docking” (B)

Uma investigação semelhante de “docking” foi realizada por Magalhães e colaboradores (2007) com o derivado 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-24) (Figura 16A) que demonstrou formação da ligação de hidrogênio no sítio ativo do PPAR (Figura 16B). O mesmo composto foi avaliado pelo protocolo experimental de “air-pouch” demonstrando boa resposta de inibição inflamatória frente ao estímulo induzido por carragenina (91%).

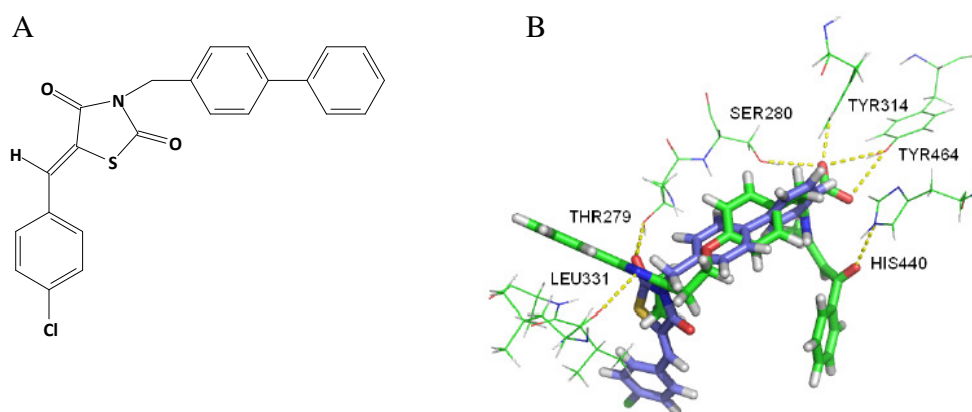


Figura 16. Formação da ligação de hidrogênio do LPSF/GQ-24 (A) (azul) e o GW 409544 (verde) no sítio ativo do PPAR (B)

Dessa forma, novos compostos derivados da tiazolidina-2,4-diona com possível ação anti-inflamatória despertam grandes expectativas no desenvolvimento de fármacos mais eficazes. Novos derivados tiazolidínicos 3,5-dissubstituídos podem proporcionar a descoberta de agentes promissores com menores efeitos adversos. Dessa forma, propomos a síntese de novos compostos da série 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona para posterior avaliação da atividade anti-inflamatória.

Referências Revisão Bibliográfica

5. Referências Revisão Bibliográfica

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª Ed. Editora Elsevier, 2008.

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. v.6603, p. 787–93, 1996.

AGGARWAL, B.B. Nuclear fator-kB: the enemy within. **Cancer Cell**. V. 6, p. 203-8, 2004.

ALHEIRA, F.V.; BRASIL, M.A.A. O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor – uma revisão **Rev. Psiquiatr**. v. 27, p.177-186, 2005.

ALI, A. M.; SABER, G. E.; MAHFOUZ, N. M.; EI-GENDY, M. A.; RADWAN, A. A.; HAMID, M. A. Synthesis and Three-dimensional Qualitative Structure Selectivity Relationship of 3,5 Disubstituted-2,4-Thiazolidinedione Derivatives As COX2 Inhibitors As COX2 Inhibitors **Arch. Pharm. Res**. V. 30, p. 1186-1204, 2007.

AMARAVADI, R.K.; THOMPSON, C.B.: The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 7271-7279, 2007.

ASEHNOUNE, K.; STRASSHEIM, D.; MITRA, S.; KIM, J.Y.; ABRAHAM, E. Involvement of reactive oxygen species in toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappaB. *J. Immunol*. v. 15, p. 2522-9, 2004.

BARBER, D.F.; BARTOLOME, A.; HERNANDEZ, C.; FLORES, J.M.; REDONDO, C.; FERNANDEZ-ARIAS, C.; CAMPS, M.; RUCKLE, T.; SCHWARZ, M.K.; RODRÍGUEZ, S. PI3K inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. **Nat. Med**. v. 11, p. 933–935, 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A Química Medicinal de N-Acildrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos Analgésicos, Antiinflamatórios e Anti-Trombóticos. **Quím. Nova.** V. 25, p. 129-148, 2002.

BARROS-GARCIA, F.J.; BERNALTE-GARCIA, A.; HIGES-ROLANDO, F.J.; LUNA-GILES, F.; MALDONADO-ROGADO, M.A.; VINUELAS-ZAHINOS, E. Synthesis, crystal structure, spectroscopic and magnetic properties of copper(II) complexes with 2-(2-pyridyl)imino-N-(2-thiazolin-2-yl)thiazolidine (PyTT). **Inorg. Chim. Acta.** V.357, p. 3574–3582, 2004.

BATTEN, M.; GHILARDI, N. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J. Mol. Med. (Berl).* v. 85, p. 661-672, 2007.

BELIZÁRIO, J. E. Citocinas: os guias das defesas do organismo. **Rev. Ciênc. Hoje.** V. 38, Nº 226, p. 36-43, 2006.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature.** v. 7090, p. 235–8, 2006.

BEZERRA, M.M.; LIMA, V.L.; ALENCAR, V.B.M.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A.C. Bloqueio seletivo da ciclooxigenase tipo 2 inibe a reabsorção óssea inflamatória em ratos. **Rev. Bras. Reumatol.** V. 41, n. 1, p. 7-13, 2001.

BORBA, E. F.; LATORRE, L. C.; BRENOL, J. C. T.; KAYSER, C.; SILVA, N. A.; ZIMMERMANN, A. F.; PADUA, P. M.; COSTALLAT, L. T. L.; BONFA, E.; SATO, E. I. Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia.** V. 48, p. 196-207, 2008.

BORGONOVO, B., COCUCCI, E., RACCHETTI, G., PODINI, P., BACHI, A., MELDOLESI, J. Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, p. 955–962, 2002.

BOZDAG-DUNDAR, O.; EVRANOS, B. ; DASX-EVCIMEN, N.; SARIKAYA, M.; ERTAN, R. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of some new chromonyl-2, 4-thiazolidinediones **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 43, p. 2412-2417, 2008.

BRADSHER, C.K.; BROWN, F.C.; SINCLAIR, E.F.J. Some analogs of 3-benzylrhodanine. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 78, n. 23, p. 6189-6192, dec.1956.

BRUNO, G.; COSTANTINO, L.; CURINGA, C.; MACCARI, R.; MONFORTE, F.; NICOLO, F.; OTTANA, R.; VIGORITA, M.G.. Synthesis and Aldose Reductase Inhibitory Activity of 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 10, p. 1077–1084, 2002.

BUCKINGHAM, R. E. Thiazolidinediones: Pleiotropic drugs with potent anti-inflammatory properties for tissue protection. **Hepato. Res**. V. 33, p.167–170, 2005.

CAMPS, M.; RUCKLE, T.; JI, H.; ARDISSONE, V.; RINTELEN, F.; SHAW, J.; FERRANDI, C.; CHABERT, C.; GILLIERON, C.; FRANCON, B. Blockade of PI3K suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. **Nat. Med.** v. 11, p. 936–943, 2005.

CARVALHO, F. N.; DIAS, R. J. S.; CARNEIRO, A. P. Miopatia por corticosteroide. **Acta Fisitr.** 11, p. 39-42, 2004.

CERVERA, R. Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the millennium: Lessons from the bEuro-Lupus Project. **Autoimmunity Reviews**, v. 5, p. 180-186, 2006.

CHANDRAPPA, S. ; BENAKA PRASAD, S. B.; VINAYA, K.; KUMAR ANANDA C. S; THIMMEGOWDA, N. R. ; RANGAPPA, K. S. Synthesis and in vitro antiproliferative activity against human cancer cell lines of novel 5-(4-methyl benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones. **Invest New Drugs**. V. 26, p.437–444, 2008.

CHEN, Z.; SHEA, J.O. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. **Immunol. Res.** v. 41, p.87–102, 2008.

CHESHIRE, J. L.; BALDWIN JR, A. S. Synergistic activation of NF-kappa B by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation. **Mol. Cell. Biol.** V. 17, p. 6746–6754, 1997.

CHUNG, Y.; YANG, X.; CHANG, S.H.; MA, L.; TIAN, Q.; DONG, C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. **Cell. Res.** v. 16, p. 902–7, 2006.

CHO, M.N.C.; LEE, W. S.; HONG, J.I.T.; PARK, S.W.; MOON, D.C.; PAIK, S.; YOON, D.O.Y. 5-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene) thiazolidine-2,4-dione modulates peroxisome proliferators-activated receptor γ in 3T3-L1 adipocytes: Roles as a PPAR γ ligand. **Mol. Cel. Endocrinol.** V. 242, p. 96–102, 2005.

CLARK, R. B.; BISHOP-BAILEY, D.; ESTRADA-HERNANDEZ, T.; HLA, T.; PUDDINGTON, L.; PADULA, S. J. The Nuclear Receptor PPAR γ and Immunoregulation: PPAR γ Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. **J. Immunol.** v.164, p. 1364-1371, 2000.

COHEN, F. E.; DU, X.; GUO, C.; MCKERROW, J. H. U.S. Patent 6 897 240, 2004.

COPE, A.C.; HOFMANN, C.M.; WYCKOFF, C.; HARDENBERGH, E. Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic esters. **J. Am. Chem. Soc.**, V. 63, p. 3452-3456, 1941.

COWEY, F.K.; WHITEHOUSE, M.W. Biochemical properties of anti-inflammatory drugs—VII. Inhibition of proteolytic enzymes in connective tissue by chloroquine (resochin) and related antimalarial/antirheumatic drugs Original Research Article **Biochemical Pharmacology**, v. 15, p. 1071-1084, 1966.

CORRIGAN, C.J.; KAY, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. **Am. Rev. Respir. Dis.** V. 141, p. 970–977, 1990.

COSTA, D.L.B.; CHANTEGREL, J.; LIMA, M.C.A.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; LIMA, R.M.O.C.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; LUU-DUC, C. Imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées: synthese, etude struture et activite cytotoxique. **J. Pharm. Belg.**, v. 50, p. 5-10, 1995.

COSTNER, M.I.; SONTHEIMER, R.D.; PROVOST, T.T. Lupus erythematosus. In: SONTHEIMER, R.D.; PROVOST, T.T. Cutaneous manifestations of rheumatic diseases. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p.15-64, 2003.

COUTO, J.A. **Novos Compostos 5-(4-metil-sulfonil-benzilideno)-imidazolidínicos e tiazolidínicos: Síntese, Elucidação Estrutural e Atividade Antiinflamatória.** 2006. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

CRISPIN, J. C; TSOKOS, G. C. IL-17 in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010). DOI:10.1155/2010/943254.

CROSBY , MI. B.; SVENSON , J.; GILKESON , G. S.; NOWLING, T. K.. A novel PPAR response element in the murine iNOS promoter **Mol. Immunol.** V.42, p. 1303–1310, 2005.

DAMIANI, D. ; SETIAN, N.; VAÊ, D. Corticosteróides - Conceitos Básicos e Aplicações Clínicas. **Pediat.** V. 6, p. 160-166, 1984.

DAVIS, J.; DAINS, F.B. **Am. Chem. Soc.**, 16, 341-145, 1935. *In*: LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Rev. Univ. Rural. Ser. Ciênc. Exatas e da Terra**, V. 18/20,n.1/2,,p.1-8 1998.

DIVEU, C.; MCGEACHY, M.J.; BONIFACE, K.; STUMHOFER, J.S.; SATHE, M.; JOYCE-SHAIKH, B.; CHEN, Y.; TATO, C.M.; MCCLANAHAN, T.K.; DE WAAL MALEFYT, R.; HUNTER, C.A.; CUA, D.J.; KASTELEIN R.A. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. **J. Immunol.** v. 182, p. 5748-5756, 2009.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; CAFFREY, C.; HOLLER, T.; MCKERROW, J.; COHEN, F. **J. Med. Chem.** V. 45, p. 2695–2703, 2002.

EUN, C. S.; HAN, D. S.; LEE, S.; PAIK, C. H.; CHUNG, Y. W.; LEE, JI.; HAHM, J. S. Attenuation of Colonic Inflammation by PPAR γ in Intestinal Epithelial Cells: Effect on Toll-like Receptor Pathway. **Digest. Dis. Sci.** V. 51, n. 4, p. 693-697, 2006.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v.11, p.571–611, 1993.

FOUGERAT, A.; GAYRAL, S.; GOURDY, P.; SCHAMBOURG, A.; RUCKLE, T.; SCHWARZ, M.K.; ROMMEL, C.; HIRSCH, E.; ARNAL, J.F.; SALLES, J.P. Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. **Circulation.** V. 117, p. 1310–1317, 2008.

FRANK, L.; VAN DE VEERDONK, M. S.; GRESNIGT, B. J. K.; VAN DER MEER, J. W. M.; JOOSTEN, L. A. B.; NETEA, M. G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. **BMB reports**. V. 42, p. 776-787, 2009.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Editora Guanabara Koogar, 10ª edição, 2003.

GONZALEZ, I. C.; LAMAR, J.; IRADIER, F.; XU, Y.; WINNEROSKI, L. L.; YORK, J.; YUMIBE, N.; ZINK, R.; RAFIZADEH, C. M.; ETGEN, G.J.; BRODERICK, C. L.; MANTLO, B. A. O. N. Design and synthesis of a novel class of dual PPARc/d agonists **Bioorg. Med. Chem. Lett.** V. 17, p. 1052–1055, 2007.

GOUVEIA, F. L.; OLIVEIRA, R. M.B.; OLIVEIRA, T. B.; SILVA, I. M.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X.F.R.; ALBUQUERQUE, J. F.C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. p. 1–6, 2008.

GHOSE, R.; MULDER, J.; FURSTENBERG, R. J. V.; THEVANANTHER, S.; KUIPERS, F.; KARPEN, S. J. Rosiglitazone attenuates suppression of RXRa-dependent gene expression in inflamed liver. **J. of Hepatol.** V.46, p. 115-123, 2007.

GREAVES, M. W. Anti-inflammatory action of corticosteroids. **Postgrad. Med. J.** v. 52, p. 631, 1976.

GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 36, p. 857–872, 1995.

GRACIET, J.C.; NIDDAM, V.; GAMBERONI, M.; TRABAUD, C.; DESSOLIN, J.; MEDOU, M.; MOURIER, N.; ZOULIM, F.; BOREL, C; HANTZ, O.; CAMPLO, M.; CHERMANN, J.C.; KRAUS, J.L. Modelisation, Synthesis and Antiviral Evaluation of

New 2,3-Disubstituted Thiazolidinone Nucleoside Analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, V. 6, p. 1775-1780, 1996.

<http://www.drjeffchandler.com/2011/12/o-lupus-eritematoso-sistemico-les.html>, acesso em 28/03/2012

HU, Y.; SHEN, F.; CRELLIN, N. K.; OUYANG, W. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** V. 1217, P. 60–76, 2011.

HUGOSSON, E.; BJORKMAN, A.; BLOMBERG, M.T. Chloroquine enhances the number of IL-10 producing cells and ICAM-1 in *In Vitro*-cultured PBMC. **Scand. J. Immunol.** v.55, p. 399-408, 2002.

HUE, S.; AHERN, P.; BUONOCORE, S.; KULLBERG, M.C.; CUA, D.J. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. **J. Exp. Med.** v. 203, p. 2473–83, 2006.

HWANG, E.S. Transcriptional Regulation of T Helper 17 Cell Differentiation. **Yonsei. Med. J.** v. 51, p. 484-491, 2010.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H.; SAIJO, S.; NAKAE, S. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members Immunity. V.34, p. 149-162, 2011.

JANG, C.H.; CHOI, J.H.; BYUN, M.S.; JUE, D.M. Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. **Rheumatology**. v. 45, p.703–710, 2006.

JEONG, J.Y.; CHOI, J.W.; JEON, K.I.; JUE, D.M. Chloroquine decreases cell-surface expression of tumor necrosis factor receptors in human histiocytic U-937 cells. **Immunology**. v. 105, p. 83-91, 2002.

KAPOOR, M.; KOJIMA, F.; YANG, L.; CROFFORD, L. J. Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: A time course study. **Prostag. Leukotr. Ess. Fatty Acids**. V. 76, p. 103–112, 2007.

KARRES, I.; KREMER, J. P.; DIETL, I.; STECKHOLZER, U.; JOCHUM, M.; ERTEL, W. Chloroquine inhibits pro-inflammatory cytokine release into human whole blood. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. v. 274, p. 1058-1064, 1998.

KIM , H. ; KIM , S.; CHANG , S.; HWANG, H. J.; CHOI, Y.N. Anti-arthritis effect of ginsenoside Rb1 on collagen induced arthritis in mice **Int. Immunopharmacol**. V.7, p. 1286–1291, 2007.

KLOTZ, L.; BURGDORF, S.; DANIL, I.; SAIJO, K.; FLOSSDORF, J.; HUCKE, S.; ALFERINK, J.; NOVAK, N.; BEYER, M.; MAYER, G.; LANGHANS, B.; KLOCKGETHER, T.; WAISMAN, A.; EBERL, G.; SCHULTZE, J.; FAMULOK, M.; KOLANUS, W.; GLASS, C.; KURTS, C.; KNOLLE, P. A. The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell–intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. **J. Exp. Med**. V. 206, p. 2079-2089, 2009.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* v. 27, p. 485–517, 2009.

KOROLKOVAS, A. Fundamentos de Farmacologia Molecular: base para o planejamento de fármacos, 2ªed., p. 74–123, 1977. *In*: SILVA, A. A. R.; GÓES, A. J.S.; LIMA, W. T.; MAIA, M. B.S. Antiedematogenic Activity of Two Thiazolidine Derivatives: *N*-Tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene) Rhodanine (GS26) and *N*-Tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2,4-thiazolidinedione (GS28) **Chem. Pharm. Bull**. V. 51, p. 1351-1355, 2003.

KOTA, B. P.; HUANG, TOM H.W.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol. Res.** V. 5, p. 85–94, 2005.

KUMAR, R.K.; WEBB, D.C.; HERBERT, C.; FOSTER, P.S. Interferon-gamma as a possible target chronic asthma. **Inflamm. Allergy Drug Targets.** V. 5, p. 253-256, 2006.

KUREBAYASHI, S.; XUA, X. ; ISHII, S. ; SHIRAISHI, M. ; KOUHARA, H.; KASAYAMA, S. A novel thiazolidinedione MCC-555 down-regulates tumor necrosis factor- α -induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. **Atherosclerosis.** V. 182, p. 71–77, 2005.

LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.** v. 2, p. 233–40, 2005.

LAPPAS, M.; PERMEZEL, M. ; HOLDSWORTH, S. J.; PORTA, G. Z. A. ; RICE, G. E. Antiinflammatory effects of the cyclopentenone isoprostane 15-A2-IsoP in human gestational tissues **Free Radical Bio. Med.** V. 42, p. 1791–1796, 2007.

LEE, J. W.; BAJWA, P. J.; CARSON, M. J.; JESKE, D. R.; CONG, Y. ; ELSON, C. O.; LYTLE, C.; STRAUS, D. S. Fenofibrate Represses Interleukin-17 and Interferon-Expression and Improves Colitis in Interleukin-10–Deficient Mice **Gastroenterology.** V. 133, p.108–123, 2006.

LEE, K. S.; KIM, S. R.; PARK, S. J.; PARK, H. S.; MIN, K. H.; JIN, S. M.; LEE, M. K.; KIM, U. H.; LEE, Y. C. Peroxisome proliferator activated receptor-g modulates reactive oxygen species generation and activation of nuclear factor-kB and hypoxia-inducible factor 1a in allergic airway disease of mice. **J. Allergy Clin. Immunol.** V. 118, n. 118, p. 121-127, 2007.

LEITE, L. F. C. C. ; PITTA, I. R. ; GALDINO, S. L. ; VIDAL, S. ; HERNANDES, M. Z. ; LIMA, M. C. A. ; BARBE, J. ; Mourão, R.H.V. ; VIEIRA, E. S. . Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies of Thiazolidinediones with Potential Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities. **Eur. J. Med. Chem.**, V. 1, p. 1, 2007.

LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNÉ, J.M. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition **Curr. Med. Chem.** V. 7, p. 1041-1062, 2000.

LIANG, S. C.; TAN, X. Y.; LUXENBERG, D. P.; KARIM, R.; DUNUSSI-
JOANNOPOULOS, K.; COLLINS, M. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J. Exp. Med.** v. 10, p. 2271–9, 2006.

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R; ALVES, A. J. Métodos de Obtenção, Reatividade e Importância Biológica de 4-Tiazolidinonas. **Quim. Nova**, V. 31, p.369-376, 2008.

LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Rev. Univ. Rural. Ser. Ciênc. Exatas e da Terra**, V. 18/20, p.1-8, 1998.

LIMA, M. C. A.; BARROS, D. L. C.; GÓES, A. J. S. ; GALDINO, S. L. ; PITTA, I. R.; LUUDUC, C. Synthese et Activite Antimicrobienne de Derives Chlorobenzyl Benzilidene Imidazolidinediones et Thiazolidinediones Substituees. *Die Pharmazie*, V. 47, p. 182-184, 1992.

LINTON, M. F.; FAZIO, S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. **Curr. Opin. Pharmacol.** V. 4, p. 116–123, 2004.

LITTLE, D.; JONES, S. L.; BLIKSLAGER, A. T. Cyclooxygenase (COX) Inhibitors and the Intestine. **J. Vet. Intern. Med.** V. 21, p. 367–377, 2007.

LIU, H.B.; HU, Y.S.; MEDCALF, R.L.; SIMPSON, R.W.; DEAR, A.E. Thiazolidinediones inhibit TNF α induction of PAI-1 independent of PPAR γ activation. **Biochem. Bioph. Res. Co.** V. 334, p. 30–37, 2005.

LOCKSLEY, R. M. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J. Exp. Med.* V. 206, p. 1643-1646, 2009.

LO, C.P.; SHROPSHIRE, E.Y.; CROXALL, W.J. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 75, p. 4845-4846, 1953. *In*: LIMA, J.G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Rev. Univ. Rural, Ciênc. Exatas e da Terra**, V. 18/20, n. 1/2, p 1-8, 1998.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. **Mol. Câncer. Res.** V.4, p. 1-13, 2006.

LUBBERTS, E. Th17 cytokines and arthritis. **Semin. Immunopathol.** V. 32, P. 43–53, 2010.

LUCAS, S.; GHILARDI, N.; LI, J.; DE SAUVAGE, F. J. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4 $^{+}$ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Proc Natl Acad Sci.** V.100, p. 15047-15052, 2003.

MACCARI, R.; PAOLO, P.; OTTANA, R.; JACOMELLI, M.; CIURLEO, R.; MANAO, G.; STEINDL, T.; LANGER, T.; VIGORITA, M. G.; CAMICI, G. 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** V. 15, p. 5137–5149, 2007.

MAGALHÃES, L.R. **Síntese e Avaliação das Atividades Anti-inflamatória e Antinociceptiva de Derivados 5-benzilideno-3-(fenil-benzil)-tiazolidina-2,4-dionas.** 2007. (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

MAENG, Y.S.; MIN, J. K. ; KIM, J.H.; YAMAGISHI, A.; MOCHIZUKI, N.; KWON, J.Y.; PARK,Y.W.; KIM, Y.M.; KWON, Y.G. ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF- κ B-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. **Cell. Signal.** V. 18, p. 994–1005, 2006.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature.** v. 441; p. 231-4, 2006.

MANTOVANI, A ; BALKWILL, F. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** . V. 357, p. 539–45, 2001.

MAZUMDER, U.K.; GUPTA, M.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S; HALDAR, P.K.; ROY, S. Evaluation of anti-inflammatory activity of Vernonia cinerea Less extract in rats. **Phytomedicine.** V. 10, p. 185–188, 2003.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 cell differentiation: The long and winding road. **Immunity.** v. 28, p. 445–453, 2008.

MELO, J. O. F. . Heterocíclicos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de separação, aplicações e atividades Farmacológicas. **Quim. Nova,** V. 29, p. 569-579, 2006.

MIN, B., PROUT, M., HU-LI, J., ZHU, J., JANKOVIC, D., MORGAN, E.S., URBAN, J.F., JR., DVORAK, A.M., FINKELMAN, F.D., LEGROS, G., AND PAUL, W.E. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. **J. Exp. Med.** V.200, p.507–517, 2004.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol. Therapeut.** V. 110, p. 371 – 385, 2006.

MOSMANN T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COVMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* v.7:p. 2348–57, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion leads to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* v. 7, p. 145–173, 1989.

MOURÃO, R.H.; SILVA, T.G.; SOARES, A.L.M.; VIEIRA, E.S.; SANTOS, J.N.; LIMA, M.C.A.; LIMA, V.L.M.; GALDINO, S.L.; BARBE, J.; PITTA, I.R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones **Eur. J. Med. Chem.** V. 40, p. 1129–1133, 2005.

MURPHY, K.M.; REINER, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat. Rev. Immunol.** v.12, p. 933–44, 2002.

NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B.Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.** V. 158, p. 670-89, 1983.

NOSAL, R.; JANCINOVA, V. Cationic amphiphilic drugs and platelet phospholipase A. **Thromb. Res.** 105, 339–345, 2002.

OTTANÀ, R.; MACCARI, R.; CIURLEO, R.; PAOLI, P.; JACOMELLI, M.; MANAO, G.; CAMICI, G.; LAGNER, C.; LANGER, T. 5-Arylidene-2-phenylimino-4-thiazolidinones as PTP1B and LMW-PTP inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** V. 17, p. 1928–1937, 2009.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity.** V. 28, p. 454-467, 2008.

OZDOL, N. C.; MELLI, M. Formation of 8-isoprostaglandin F2a and prostaglandin E2 in carrageenan-induced air pouch model in rats. **Eur. J. Pharmacol.** V. 506, p. 189– 197, 2004.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X. O.; CHANG, S. H.; NURIEVA, R.; WANG, Y. H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat. Immunol.** v. 6, p.1133-1141, 2005.

PENG, X.D.; WU, X.H.; CHEN, L.; WANG, Z.; HU, X.; SONG, L.; HE, C.; LUO, Y.; CHEN, Z.; JIN, K.; LIN, H.; LI, X.; WANG, Y.; WEI, Y. Inhibition of Phosphoinositide 3-Kinase Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. **The J. Pharmacol. Exp. Therap.** V. 332, p. 46-56, 2010.

PEREIRA, D.T.M. **Síntese, Comprovação Estrutural e Atividade Antiinflamatória de Compostos Tiazolidinônicos-3,5-Dissubstituídos.** 2007. (Doutorado em Ciências Biológicas) Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.

PICOT, S.; PEYRON, F.; DONADILLE, A.; VUILLEZ, J.P.; BARBE, G. P.; THOMAS, A.. Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. **Immunology.** v. 80, p. 127-133, 1993.

PITTA, I.R.; LIMA, M.C.A; GALDINO, S; BARBE, J. Compostos arilidenotiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica Br, PI 0144/02 em 10/04/2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia.** 5ª Edição, Editora Elsevier, 2004.

RAWAL, R. K.; TRIPATHI, R.; KATTI, S. B.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERQ, E.
Bioorg. Med.Chem. V. 15, p. 1725–1731, 2007.

RIZZO, G.; FIORUCCI, S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation.
Curr. Opin. Pharmacol. V. 6, p. 421–427, 2006.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6^a Ed. Editora Manole, 2003.

ROLLINS, M. D.; SUDARSHAN, S.; FIRPO, M. A.; ETHERINGTON, B. H.; HART, B. J.; JACKSON, H. H.; JACKSON, J. D.; EMERSON, L. L.; YANG, D. T.; MULVIHILL, S. J.; GLASGOW, R. E. Anti-inflammatory Effects of PPAR-g Agonists Directly Correlate With PPAR-g Expression During Acute Pancreatitis **J. Gastrointest. Surg.** V. 10, p. 1120–1130, 2006.

ROMAGNANI, S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. J.
Allergy. Clin. Immunol. V.113, p. 395-400, 2004.

RYNES, R. I. Hydroxychloroquine treatment of rheumatoid arthritis. **Original Research Article The American Journal of Medicine.** v.85, p.18-22, 1988.

RUS, V.; ATAMAS, S. P.; SHUSTOVA, V.; LUZINA, I. G.; SELARU, F.; MAGDER, L. S.; CHARLES, S. Via Expression of Cytokine- and Chemokine-Related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Lupus Patients by cDNA Array. **Clinical Immunology.** V. 102, p. 283-290, 2002.

SANTOS, L. C.; UCHÔA, F. T.; MOURA, R. O.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; BAERBE, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of new thiazolidine-2,4-diones, 4-thioxothiazolidinones and 2-thioxoimidazolidinones. **Heterocyclic Communications**, V.11, p.121-128, 2005.

SMOLEN, J. S.; LANDEWÉ, R.; BREEDVELD, F. C.; DOUGADOS, M.; EMERY, P.; GAUJOUX-VIALA, C.; GORTER, S.; KNEVEL, R.; NAM, J.; SCHOELS, M.; ALETAHA, D.; BUCH, M.; GOSSEC, L.; HUIZINGA, T.; BIJLSMA, J. W.; BURMESTER, G.; COMBE, B.; CUTOLO, M.; GABAY, C.; GOMEZ-REINO, J.; KOULOUMAS, M.; KVIEN, T. K.; MARTIN-MOLA, E.; MCINNES, I.; PAVELKA, K.; VAN RIEL, P.; SCHOLTE, M.; SCOTT, D. L.; SOKKA, T.; VALESINI, G.; VAN VOLLENHOVEN, R.; WINTHROP, K.L.; WONG, J.; ZINK, A.; VAN DER HEIJDE, D. EULAR recommendations for the management of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.* V.69, p. 964–975, 2010.

SATO, E.I.; BONFÁ, E.D.; COSTALLAT, L.T.L.; SILVA, N.A.; BRENOL, J.C.T.; SANTIAGO, M.B.; SZAJUBOK, J.C.M.; RACHID-FILHO, A.; BARROS, R.T.; SUNG, B.; PARK, S.; YU, B. P.; CHUNG, H. Y. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPAR γ activator: Suppression of NF- κ B by 2,4-thiazolidinedione. **Exp. Gerontol.** V. 4, p. 590–599, 2006.

SASAKI, K.; TSUNO, N.H.; SUNAMI, E.; TSURITA, G.; KAWAIL, K.; OKAJI Y.; NISHIKAWA, T.; SHUNO, Y.; HONGO, K.; HIYOSHI, M.; K. MANABU; KITAYAMA, J.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA, H. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. **BMC Cancer**, v. 10, p.370, 2010.

SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: history of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. **Chem. Med. Chem.** v. 2, p. 944–986, 2007.

SCHUBERT, C.; HONG, S.; NATARAJAN, L.; MILLS, P. J.; DIMSDALE, J. E. The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: A quantitative review. **Brain Behav. Immun.** V. 2, p. 413–427, 2007.

SCHÄCKE, H.; SCHOTTELIUS, A.; DÖCKE, W. D.; STREHLKE, P.; JAROCH, S.; SCHMEES, N.; REHWINKEL, H.; HENNEKES H.; ASADULLAH, K. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. **Immunology**. v. 1, p. 227–232, 2004.

SHINKAI, K.; MOHRS, M.; LOCKSLEY, R.M. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. **Nature**. v. 420, p. 825–829, 2002.

SOLOMON, V. R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**. v. 625, p. 220–233, 2009.

STIENSTRA, R.; MANDARD, S.; TAN, N. S.; WAHLI, W.; TRAUTWEIN, C.; RICHARDSON, T. A.; LICHTENAUER-KALIGIS, E.; KERSTEN, S.; MULLER, M. The Interleukin-1 receptor antagonist is a direct target gene of PPARα in liver. **J. Hepatol.** V. 46, p. 869–877, 2007.

STOCKS, P.A.; RAYNES, K.J.; WARD, S.A. Novel quinoline antimalarials. In: Rosenthal, P.J. (Ed.), *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*. Humana, Totowa, p. 235–253, 2001.

STUMHOFER, J.S.; LAURENCE, A.; WILSON, E.H.; HUANG, E.; TATO, C.M.; JOHNSON, L.M.; VILLARINO, A.V.; HUANG, Q.; YOSHIMURA, A.; SEHY, D.; SARIS, C.J.; O'SHEA, J.J.; HENNIGHAUSEN, L.; ERNST, M.; HUNTER, C.A. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. **Nat. Immunol.** v. 7, p. 937–945, 2006.

TASDEMİR, E.; GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; CRIOLLO, A.; VITALE, I.; HANGEN, E.; MODJTAHEDI, N.; KROEMER, G.: Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. **Methods Mol Biol**, v. 445, p. 29-76, 2008.

TEN HACKEN, N.H.T.; OOSTERHOFF, Y.; KAUFFMAN, H.F.; GUEVARRA, L.; SATOH, T.; TOLLERUD, D.J.; POSTMA, D.S. Elevated serum interferon- γ in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation **Eur. Respir. J.** v. 11, p. 312–316, 1998.

TORUNER, C. Y.; DIAMOND, B.; Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus **J. Allergy Clin. Immunol.** v.127, p.303-12, 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications **Vasc. Pharmacol.** V.45, p. 19–28, 2006.

TROST, B.M. Comprehensive Organic Synthesis. 1^a Ed. Editora Elsevier, 1991.

TSENG, S. H.; LEE, H. H.; CHENB, L. G.; WU, C. H.; WANG, C. C. Effects of three purgative decoctions on inflammatory mediators. **J. Ethnopharmacol.** V.105, p. 118–124, 2006.

UCHÔA, F. T.; SILVA, T. G.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I.R.; COSTA, T. D. Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** V. 61, p. 339–345, 2009.

VAN DEN BORNE, B.E.; DIJKMANS, B.A.; DE ROOIJ, H.H.; LE CESSIE, S.; VERWEIJ, C.L. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor- α , interleukin 6, and interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells. **J. Rheumatol.** v.1, p. 55-60, 1997.

VASCONCELOS, M. Acometimento Cutâneo/Articular. **Rev Assoc Med Bras**, v. 52, p. 375-88, 2006.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**. v. 24, p. 179–89, 2006.

VICINI, P.; GERONIKAKI, A.; ANASTÁSIA, K.; INCERTI, M.; ZANI, F.; **Bioorg. Med. Chem.**, V. 14, p. 3859, 2006.

VILLARINO, A. V.; STUMHOFER, J. S.; SARIS, C. J. M.; KASTELEIN, R. A.; DE SAUVAGE, F. J.; HUNTER, C. A. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. **J. Immunol.** v. 176, p. 237-247, 2006.

YOSHIDA, H.; NAKAYA, M.; MIYAZAKI, Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. **J. Leukoc. Biol.** V. 86, p. 1295-1303, 2009.

YIN, F., GUO, M., YAO, S. Kinetics of DNA binding with chloroquine phosphate using capacitive sensing method. **Biosens. Bioelectron.** v.19, p. 297–304, 2003.

WEBER, S. M.; CHEN, J.M.; LEVITZ, S. M. Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling by Chloroquine. **Journal of Immunology**. v. 168, p. 5303–5309, 2002.

WIESNER, J.; ORTMANN, R.; JOMAA, H.; SCHLITZER, M. New antimalarial drugs. **Chem. Int. Ed. Engl.** v. 42, p. 5274–5293, 2003.

WIJK, J.P.H. V.; CABEZAS, M. CASTRO; COLL, B.; JOVEN, J.;RABELINK, T.J.; DE KONING, E.J.P. Effects of rosiglitazone on postprandial leukocytes and cytokines in type 2 diabetes **Atherosclerosis** V. 186, p. 152–159, 2006.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R.; GILROY, D.
Resolution of inflammation. **Inter. J. Immunopharmacol.** V. 22, p. 1131–1135, 2000.

WOZNIACKA, A; LESIAK, A; NARBUTT, J; MCCAULIFFE, D.P.; SYSA-JEDRZEJOWSKA, A. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. **Lupus.** v.5, p. 268-75, 2006.

WOZNIACKA, A; LESIAK, A.; BONCELA, J., SMOLARCZYK, K.; MCCAULIFFE, D.P.; SYSA-JEDRZEJOWSKA, A. The influence of antimalarial treatment on IL-1-beta, IL-6 and TNF-alpha mRNA expression on UVB-irradiated skin in systemic lupus erythematosus. **Br. J. Dermatol.** v.159, p.1124-30, 2008.

ZABICKY, J. The kinetics and mechanism of carbonyl–methylene condensation reactions. **J. Chem. Soc.** p. 687-690, 1961.

ZARGHI, A.; NAJAFNIA, L.; DARAEE, B.; DADRASSC, O. G.; HEDAYATI, M. Synthesis of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidine-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, V.17, p. 5634–5637, 2007.

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada.** 5^a.ed. Editora Atheneu, 1994.

ZHAO, H., CAI, Y., SANTI, S., LAFRENIE, R., LEE, H. Chloroquine-mediated radiosensitization is due to the destabilization of the lysosomal membrane and subsequent induction of cell death by necrosis. **Radiat. Res.** v.164, p.250–257, 2005.

Artigo I

Artigo 1

Synthesis and anti-inflammatory activity of 3,5-Disubstituted-2,4 thiazolidinedione derivatives

Acta Pharmaceutica

ISSN: 1330-0075

Impact factor: 1.39

Synthesis and anti-inflammatory activity of 3,5-Disubstituted-2,4
thiazolidinedione derivatives

*Juliana C. SILVA¹, Cleiton D. BARROS¹, Talitha S. LIMA¹, Flaviana A. dos SANTOS², Teresinha GONÇALVES-SILVA¹, Máira G. R. PITTA², Maria C. A. de LIMA¹, Suely L. GALDINO¹, Ivan R. PITTA¹

¹ *Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE
50670-910, Brazil*

² *Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-
910, Brazil*

ABSTRACT

Ten new 3,5-Disubstituted-2,4 thiazolidinedione derivatives were synthesized and assayed *in vitro* and *in vivo* to investigate their anti-inflammatory activities. Thiazolidine-2,4-dione was *N*-(3)-alkylated and then the 5-(benzylidene)-3-(benzyl)-thiazolidine-2,4-dione was prepared with the respective aryl-substituted ethyl-(2-cyano-3-phenyl)-acrylates. All compounds tested, except for LPSF/GQ-114 and LPSF/GQ-118, showed inhibitory activity of cytokines IFN-gamma and IL-17A after stimulation with Con A in culture supernatants of splenocytes from BALB/c in the dose of 100 µM. The compounds

LPS/GQ-92, LPSF/GQ-113B and LPSF/GQ-57 showed considerable biological efficacy in vivo when compared to rosiglitazone, a potent and well-known agonist of PPAR γ , which was used as a reference drug. This suggests that thiazolidine-2,4-diones substituted at positions 3 and 5 groups play important roles in the anti-inflammatory properties of this class of compounds.

KEY WORDS: anti-inflammatory activity, air-pouch, splenocytes, IL-17A, thiazolidinedione derivatives.

*Correspondence; e-mail: julianacruz82@gmail.com

INTRODUCTION

The chronic inflammatory response is present in many diseases such as autoimmune (1,2) and airway (3,4). IFN- γ and IL-17 are pro-inflammatory cytokines that modulate the chronic inflammatory process. The IFN- γ is a pleiotropic cytokine that is important in regulating immune and inflammatory processes due to their participation in the activation of transcription factors such as κ B (NF- κ B)(5,6). Studies attribute high levels of IFN- γ in patients with asthma and a possible target in chronic asthma (7-9). A new subset of T helper cells called Th17 cells has been described produces pro-inflammatory cytokines including IL-17A and IL-22 (10-12). IL-17 production increased

in patients with SLE can amplify the immune response by increasing target organ inflammation and damage and by augmenting the production of antibodies by B cells (13). Interleukin-17A and IL-22 contributes to the pathogenesis of arthritis as has been shown in several experimental arthritis models (14). In addition, strategies that specifically block this pathway may provide the next generation of efficacious therapies (15).

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor superfamily which are ligand-activated transcription factors. The involvement of PPAR γ in inflammatory processes is suggested by the antagonism between the activities of pro-inflammatory cytokines and PPAR γ as well as their participation in the modulation of NF-kB (16-18). Thus, this receptor is an attractive target for developing anti-inflammatory agents due to their role in the inflammatory process. Several studies have shown thiazolidine-2,4-dione of PPAR- γ activators, such as rosiglitazone and pioglitazone, as responsible for the inhibition of pro-inflammatory cytokines (19,20). Both compounds have the structure in the core thiazolidine-2,4-dione being responsible for most of its pharmacological effects, including anti-inflammatory effects (21,22).

In present study, we have demonstrated the synthesis of the news 3,5-disubstituted-2,4-thiazolidinedione. The chemical structures of all synthesized compounds were confirmed by IR, ^1H -RMN and MS. The synthesized compounds were screened for their *in vitro* anti-inflammatory activity in splenocytes from mouse BALB/c and *in vivo* anti-inflammatory activity for carrageenan-induced air pouch.

EXPERIMENTAL

Synthesis

Thiazolidine-2,4-dione (1) was *N*-(3)-alkylated in the presence of sodium hydroxide, which enables the thiazolidine sodium salt, to react with benzyl halide in a hot ethanol medium, affording the intermediate LPSF/GQ-54 and LPSF/GQ-56 as described in the Scheme 1. The 5-(benzylidene)-3-(benzyl)-thiazolidine-2,4-dione was prepared by an nucleophilic Michael addition of the intermediate LPSF/GQ-54 and LPSF/GQ-56 and the respective aryl-substituted ethyl-(2-cyano-3-phenyl)-acrylates (23), for obtain the arylidene-thiazolidine-2,4-dione LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-62, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92, LPSF/GQ-113B, LPSF/GQ-114 and LPSF/GQ-118 (Scheme 1). After cooling, precipitate was purified by column chromatography or crystallized in suitable solvents. The ethyl-(2-cyano-3-phenyl)-acrylate was prepared by Knoevenagel condensation of ethyl cyanoacetic ester and substituted benzaldehydes with added piperidine. The arylidene-thiazolidine-2,4-dione was isolated in a single isomer form, as verified in IR, MS and ¹H-NMR (Table 1 and 2) analysis. X-ray crystallographic studies and ¹³C NMR have demonstrated the preferred *Z* configuration for 5-arylidene-thiazolidinones (24-26).

Insert here scheme 1

Insert here table 1

Insert here table 2

Compounds

Sodium dodecyl sulfate (SDS, purity 98.5%), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, purity 98%), Hydroxychloroquine sulphate (purity 98%), 6 α -methylprednisolone and concanavalin A (Con A), Tween 80 and carrageenan were purchased from Sigma-Aldrich®, Brazil. EDTA was purchased from Labtest, São Paulo, Brazil.

Animals

Experimental assays utilized mice BALB/c (male and female, 45 days old). The animals were raised and maintained at the animal facilities of the Laboratory of Immunopatologia Keizo Asami (LIKA) (University Federal of Pernambuco, Recife, Brazil). The guidelines of the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Universidade Federal de Pernambuco were followed.

Carrageenan-induced air pouch

The anti-inflammatory effect was tested by the production of air pouches on the dorsal cervical region of mice of 25-30 g by a subcutaneous injection of 2.5 mL of sterile air on day 0, followed by a second injection of 2.5 mL of sterile air 3 days later. On day six, the mice received vehicle, Rosiglitazone, LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B (3 mg/kg) orally. All drugs were dissolved in saline, except for the thiazolidinics compounds, which were dissolved in saline containing 5% Tween 80. One hour after drug administration, inflammation was induced by injecting 1 mL of 1% (w/v) carrageenan suspension into

the air pouch. After 6 h, the mice were sacrificed by CO₂ gas, and the pouches were washed with 3 mL of saline solution containing 3 μM of EDTA. The number of migrated neutrophils were determined by staining with Turk's solution (0.01% crystal violet in 3% acetic acid) and counted using a Neubauer hemocytometer.

Preparation of splenocytes

After killing the animals with CO₂ gas, the spleen of each mouse was removed aseptically and placed in a Petri dish containing RPMI-1640 (GIBCO). In a vertical flow, each spleen was transferred to another Petri dish where they were soaked. The cell suspensions obtained from each spleen were filtered in a Cell Systrainer 40μm nylon (BD Falcon™) and then transferred to Falcon tubes containing. Spleen homogenates were then centrifuged twice at 300g for 10 min. Cells were then lysis with 1X RBC lysis buffer (eBiosciences). Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%.

Splenocytes cultures

Splenocytes (1 x 10⁶ cell/well) were cultured in 24-well plates (TPP) in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), HEPES 10mM (GIBCO) and penicillin/streptomycin 200U/mL (GIBCO). The cells were stimulated or not and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator.

Cytokine titration

Cytokines in the supernatants of cultures were assayed with ELISA kits according to the manufacturer's instructions. In cultures supernatants from splenocytes: IFN- γ (BD Bioscience) and IL-17A (eBiosciences) levels were measured at 48 hours. The lower limits of detection for the ELISA analyses were as follows: 7,812 pg/ml for IL-17A and 15,62 pg/ml for IFN- γ .

In vitro cell viability - MTT assay

The potential effects on cell viability were investigated by using the MTT assay using [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] as an indicator of metabolically active cells (27,28). The splenocytes (2×10^6 cells) were transferred into 96 well plates in a volume of 100 μ l of culture medium and incubated for 48 h before addition of test compound. Cells were then exposed to known concentrations of the compound to be tested (100 μ M expressed as final concentration) for 48 h at 37°C. After drug exposure, 20 μ l of MTT reagent (diluted in culture medium, 0.5 mg/ml) was added. After incubating for 3 h, SDS (130 μ l) was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance of the colored solution was measured on a microtiter plate reader using a test wavelength of 570 nm. Results were evaluated by comparing the absorbance of the wells containing compound treated cells with the absorbance of wells containing 0.1% DMSO alone (solvent control). Conventionally, cell viability was estimated to be 100% in the solvent control. All assays were performed in triplicate and mean $\pm$ SD values were used to estimate cell viability.

Statistical Analysis

Associations of supernatants IFN- γ and IL-17A levels of cells treated with compounds and the control cells parameters were analyzed by univariate comparisons using nonparametric tests (Mann-Whitney tests). $P < 0.05$ was considered as indicating a significant association. The results are shown considering the mean value with error bars. All quantitative data were plotted with SPSS 13.0 software. The *in vivo* activity data were presented values are significant ($p < 0.05$) confidence interval (ANOVA, Bonferroni test). All quantitative data were plotted with Origin 8.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Cell viability by MTT assay

In the first step we evaluated the percentage of cell viability of spleen cells treated with thiazolidinic compounds synthesized at the dose of 100 μ M (Table 3). We found that the compound LPSF/GQ-64 showed moderate toxicity (63% cell viability) when compared to other compounds and compared with control cells. The compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B had percentages of cell viability greater than 70% compared with control cells.

Insert here table 3.

Effect of thiazolidine-2,4-dione derivatives in the production of IFN- γ

In the second step of this study we are interested in seeing the effect of all thiazolidine derivatives showed that percentage of cell viability greater than 70% toxic by MTT method in inhibiting production of IFN- γ after stimulation with Con A. The levels measured IFN- γ released into the culture medium was measured by ELISA (Figure 1). The IFN- γ production were negligible in non-stimulated cells. Whereas addition of Con A induced a remarkable increase in the level of this cytokine in spleen cells. Maximum production of IFN- γ by splenocytes stimulated with Con A was attained after 48h (Figure 1). The compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B showed significant ($p=0.001$, 0.001 , 0.004 , 0.004 , 0.001 , 0.001 and 0.001 , respectively) activity *in vitro* inhibition of IFN- γ at a dose of 100 μ M in comparison with the control cells. Ours results also demonstrated the concentration of IFN- γ in the cells treated with standards compounds, MP and HCQ in the concentration of 100 μ M significantly ($p=0.0006$ to both) decreases compared with the control.

Insert here figure 1.

Effect of thiazolidine-2,4-dione derivatives in the production of IL-17A

After we compared the effects in the inhibition of cytokine IL-17A in splenocytes that were stimulated for 48h with Con A in the presence or not of the compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92 and

LPSF/GQ-113B in the concentrations of 1, 10 and 100 μ M (Figure 2). As the cells evaluated for IFN- γ , the IL-17A production were negligible in non-stimulated cells. Moreover, the addition of Con A induced a remarkable increase in the level of this cytokine in spleen cells released into the culture medium was measured by ELISA (Figure 2). Maximum production of IL-17A by splenocytes stimulated with Con A was attained after 48h. Our results showed that the highest levels of inhibition of IL-17 were significant ($p=0.015$ to all) for the dose of 100 μ M of the three compounds evaluated. The cells treated with the derivative LPSF/GQ-113B showed significant ($p=0.007$ to dose of 1 μ M and $p=0.035$ to dose of 10 μ M) levels of IL-17A in a dose-dependent manner when compared with the control. Compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61 and LPSF/GQ-92 showed no significant ($p>0.05$) inhibition of IL-17A at concentrations of 1 μ M and 10 μ M compared with control cells. The standards compounds, MP and HCQ, in the concentration of 100 μ M also inhibited significantly ($p=0.035$ to both) the production of IL-17A when compared with control.

Insert here figure 2

Effect of thiazolidine-2,4-dione derivatives in Carrageenan-induced air pouch

In the next stage of our studies evaluated the *in vivo* activity of compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B in the carrageenan-induced air pouch experimental model showing percentage inhibition of cell migration between 24% and 66% (Table 4). The carrageenan-induced air pouch model is known to be an excellent acute inflammatory model in which fluid

extravasation, leukocyte migration, and various biochemical exudate parameters involved in the inflammatory response can be detected readily (29). The subcutaneous air pouch model, an animal model that mimics rheumatoid arthritis, is commonly used as a test for screening antiarthritic compounds. The air pouch, injected in the back of the animal, forms a membrane with characteristics similar to the inflamed synovium of patients with RA (30). Still, also underscore the inflammatory carrageenan-induced air pouch model, effectively the migration of neutrophils and suggest that it is a valuable tool in the evaluation of new anti-arthritis drugs (31,32). The compounds studied LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B exhibited significant ($p < 0.05$) anti-inflammatory activities and reduced carrageenan-induced cell migration (Table 4). Suggesting it that these substances may be potential anti-arthritic drug candidates. Rosiglitazone, standard compound used, is a PPAR- γ activator (33,34) showed percentage inhibition of leukocyte 72%. Air pouch experiments performed by Barros et al., 2010 (25), showed that rosiglitazone is able to reduce cell migration. In the same study new 3,5-disubstituted-thiazolidine-2,4-dione derivatives exhibited anti-inflammatory activity in the model of carrageenan-induced air-pouch. In this context, we suggest that the compounds that we tested may be characterized by a similar mechanism of action. Moreover, further studies are needed.

Insert here table 4

CONCLUSIONS

In summary, novel 3,5-disubstituted-thiazolidine-2,4-diones derivatives were synthesized, characterized based on their physical, and spectral data, and evaluated for their *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory.

The studies have revealed that the compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B showed best anti-inflammatory activities. *In vitro* experiments these derivatives inhibited the production of IFN- γ and IL-17A after stimulation with Con A. The same compounds were evaluated *in vivo* experimental model showing increasing percentage of inhibition of cell migration. These compounds may be promising drug candidates to treat autoimmune diseases, such as SLE and RA and airways, such as asthma.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia (FACEPE), for financial support.

REFERENCES

1. C. Yildirim-Toruner and B. Diamond, Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus, *J. Allergy Clin. Immunol.* **127** (2011) 303-12; DOI:10.1016/j.jaci.2010.12.1087.

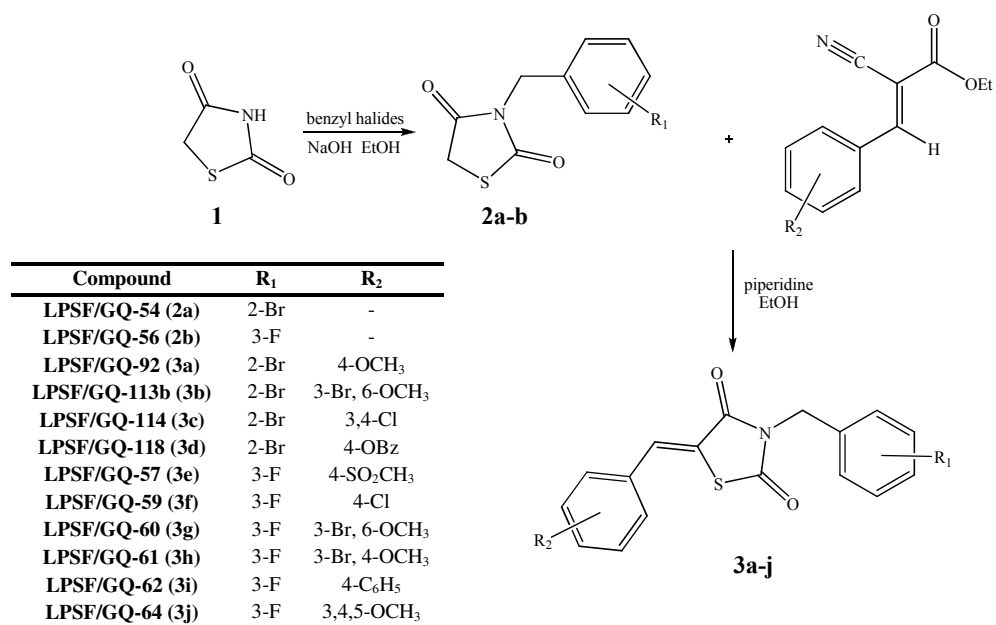
2. E. H., Choy and G. S. Panayi.. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **344** (2001) 907–916.
3. W.W. Busse and R.F. Lemanske, Asthma. *N. Engl. J. Med.* **344** (2001) 350–362. DOI: 10.1038/nio802-715.
4. D.T. Umetsu, J.J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas and R.H. DeKruyff. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.* **3** (2002) 715–720; DOI:10.1038/ni0802-715.
5. M. A. Farrar and R. D. Schreiber, The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **11** (1993) 571–611.
6. J. L. Cheshire and A. S. Baldwin Jr, Synergistic activation of NF-kappa B by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation, *Mol. Cell. Biol.* **17** (1997) 6746–6754.
7. C.J. Corrigan and A.B. Kay, CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* **141** (1990) 970–977.
8. N.H.T. ten Hacken, Y. Oosterhoff, H.F. Kauffman, L. Guevarra, T. Satoh, D.J. Tollerud and D.S. Postma, Elevated serum interferon- γ in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation *Eur. Respir. J.* **11** (1998) 312–316 DOI: 10.1183/09031936.98.11020312.
9. R.K. Kumar, D.C. Webb, C. Herbert and P.S. Foster, Interferon-gamma as a possible target chronic asthma, *Inflamm. Allergy Drug Targets.* **5** (2006) 253-256.

10. H. Park, Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, C. Dong, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, *Nat. Immunol.* **6** (2005) 1133-1141.
11. M.J. McGeachy, D.J. Cua., Th17 cell differentiation: The long and winding road. *Immunity* **28** (2008) 445–453.
12. S. C. Liang, X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **10** (2006) 2271–9.
13. A. Nalbandian, J. C. Crispín, G. C. Tsokos, Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clinical and Experimental Immunology.* **157** 209–215 DOI:10.1111/j.1365-2249.2009.03944.x
14. E. Lubberts. Th17 cytokines and arthritis. *Semin. Immunopathol.* **32** (2010) 43-53; DOI 10.1007/s00281-009-0189-9
15. Y. Hu, F. Shen, N. K. Crellin, W. Ouyang. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases **1217** (2011) 60–76; DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05825.x
16. Ricote, M.; Li, A. C.; Willson, T. M.; Kelly, J.; Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* **391** (1998), 79-82; DOI: 10.1038/34178.
17. G. Haraguchi, Y. Kobayashi, M.L. Brown, A. Tanaka, M. Isobe, S.H Gianturco and W.A. Bradley, PPAR(α) and PPAR(γ) activators suppress the

- monocyte-macrophage apoB-48receptor. *J. Lipid. Res.* **44** (2003) 1224–31; DOI: 10.1194/jlr.M300077-JLR200.
18. B. P. Kota, T. H.W.Huang and B. D. Roufogalis, An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* **51** (2005) 85–94; DOI:10.1016/j.phrs.2004.07.012.
 19. M. Sánchez-Hidalgo, A. R. Martín, I. Villegas, C. A. de la Lastra, Rosiglitazone, a PPAR γ ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats *European Journal of Pharmacology* **562** (2007) 247–258; DOI:10.1016/j.ejphar.2007.01.047.
 20. S. Hazra, R. K. Batra, H. H. Tai, S. Sharma, X. Cui and S. M. Dubinett, Pioglitazone and Rosiglitazone Decrease Prostaglandin E2 in Non–Small-Cell Lung Cancer Cells by Up-Regulating 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase *Mol. Pharmacol.* **71** (2007) 1715–1720; DOI: 10.1124/mol.106.033357.
 21. R. Komers and A. Vrana, Thiazolidinediones-Tools for the Research of Metabolic Syndrome X. *Physiol. Res.* **47** (1998) 215-225.
 22. T. M. Willson and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Current Opinion in Chemical Biology* **1** (1997) 235-241; DOI:10.1016/S1367-5931(97)80015-4.
 23. R.H. Mourão, T.G. Silva, A.L.M. Soares, E.S. Vieira, J.N. Santos, M.C.A. Lima, V.L.M. Lima, S.L. Galdino, J. Barbe, I.R. Pitta Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *Eur. J. Med. Chem.* **40** (2005) 1129–1133;
 24. S.F. Tan, K.P. Ang, Y.F. Fong. (Z)-5-ARYLMETHYLENEHYDANTOINS AND (E)-5-ARYLMETHYLENEHYDANTOINS - SPECTROSCOPIC PROPERTIES

- AND CONFIGURATION ASSIGNMENT. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*. **2** (1986) 1941-4.
25. C. D. Barros, A. A. Amato, T. B. de Oliveira, K. B. R. Iannini, A. L. da Silva, T. G. da Silva, E. S. Leite, M. Z. Hernandez, M. C. A. de Lima, S. L. Galdino, F. A. R. Neves, I. R. Pitta, Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR- γ ligands, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 3805-3811; DOI:10.1016/j.bmc.2010.04.045
 26. L. Leite, R.H.V. Mourao, M.D.A. de Lima, S.L. Galdino, M.Z. Hernandez, F.D.R. Neves. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **42** (2007) 1263-71;
 27. M. V. Berridge, A. S.Tan, K. D. McCOY, R.WANG. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*. **4** (1996) 14-19;
 28. T. Mossman. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65** (1983) 55-63;
 29. H.J. Koo, K.H. Lim, H.J. Jung, E.H. Park, Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J. Ethnopharmacol.* **103**, (2006) 496-500;
 30. A.D. Sedgwick, P. Lees. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents and Actions* **18** (1986) 439-46.

31. G. F. Passos, E.S. Fernandes, F.M. da Cunha, Ferreira, J.; Pianowski, L. F.; Camposa, M. M.; Calixto, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea*, *J. Ethnopharmacol.* **110** (2007) 323-333;
32. G. F. Passos, E. S. Fernandes, F. M. Cunha, J. Ferreira, L.F. Pianowski, M.M. Camposa, J.B. Calixto, Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea* *J. Ethnopharmacol.* **110** (2007) 323–333.
33. P.J. Boyle, A.B. King, L. Olansky, A. Marchetti, H. Lau, R. Magar, J. Martin, Effects of pioglitazone on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective review of randomly selected medical records, *Clin. Ther.* **24** (2002) 378-396.
34. J. Chilcott, P. Tappenden, M. L. Jones, and J. P. Wight, A systematic review of the clinical effectiveness of pioglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Clin. Ther.* **23** (2001) 1792-1823; DOI: 10.1016/S0149-2918(00)80078-8.



Scheme 1. Synthetic route for 3,5-disubstituted-2,4 thiazolidinedione derivatives

Table 1. Physical and HRMS data of compounds

Compd.	Yield (%)	M. p. (°C)	Molecular formula (Exact mass)	MS <i>m/z</i> (ESI+)
LPSF/GQ-92	69,15	188-189	C ₁₈ H ₁₄ BrNO ₃ S (402,9878)	425 ^b
LPSF/GQ-113B	77,39	129-131	C ₁₈ H ₁₃ Br ₂ NO ₃ S (480,8983)	-----
LPSF/GQ-114	44,45	170-172	C ₁₇ H ₁₀ BrCl ₂ NO ₂ S (440,8993)	
LPSF/GQ-118	52	160-162	C ₂₄ H ₁₈ BrNO ₃ S (479,0191)	
LPSF/GQ-57	31	207-207	C ₁₈ H ₁₄ FNO ₄ S ₂ (391,0348)	414 ^b ; 430 ^c
LPSF/GQ-59	76	143-145	C ₁₇ H ₁₁ ClFNO ₂ S (347,0183)	
LPSF/GQ-60	67	135-136	C ₁₈ H ₁₃ BrFNO ₃ S (420,9784)	
LPSF/GQ-61	57	150-151	C ₁₈ H ₁₃ BrFNO ₃ S (420,9784)	
LPSF/GQ-62	59	157-159	C ₂₃ H ₁₆ FNO ₂ S (389,0886)	390 ^a ; 412 ^b
LPSF/GQ-64	54	108-112	C ₂₀ H ₁₈ FNO ₅ S (403,0890)	

^a [M+H]⁺; ^b [M+Na]⁺; ^c [M+K]⁺

Table 2. Spectral data of compounds

Compd.	IR (KBr) ($\nu_{\max}$, cm^{-1})	^1H NMR (δ ppm) ^a
LPSF/GQ-92	1587(CH) 1687(C=O) 1730(C=O)	3.84 (s, 3H, OCH ₃), 4.85 (s, 2H, CH ₂), 7.14 (d, 2H, Ar-H, J = 8.99 Hz), 7.16 (dd, 1H, Ar-H, J =7.49 Hz), 7.26 (dt, 1H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =7.49 Hz), 7.36 (dt, 1H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =7.49 Hz), 7.64 (d, 2H, Ar-H, J = 8.99 Hz), 7.67 (dd, 1H, Ar-H, J =8.39), 7.96 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-113B	1587(CH) 1687(C=O) 1738(C=O)	3.9 (s, 3H, OCH ₃), 4.85 (s, 2H, CH ₂), 7.16 (d, 1H, Ar-H, J =8.99 Hz), 7.19 (dd, 1H, Ar-H, J =7.19 Hz), 7.26 (dt, 1H, Ar-H, J =1.79 Hz, J =7.79 Hz), 7.36 (dt, 1H, Ar-H, J =1.19, J =7.49 Hz), 7.58 (d, 1H, Ar-H, J =2.39 Hz), 7.66 (dd, 1H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =6.29 Hz), 7.69 (dd, 1H, Ar-H, J =2.39 Hz, J =6.29), 7.98 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-114	1609(CH) 1690(C=O) 1738(C=O)	4.86 (s, 2H, CH ₂), 7.21 (dd, 1H, Ar-H, J =7.79 Hz), 7.26 (dt, 1H, Ar-H, J =1.49 Hz, J =7.49 Hz), 7.36 (dt, 1H, Ar-H, J =2.09 Hz, J =8.39 Hz), 7.61 (dd, 1H, Ar-H, J =2.09 Hz, J =8.39 Hz), 7.67 (dd, 1H, Ar-H, J =7.79 Hz), 7.83 (d, 1H, Ar-H, J =8.69 Hz), 7.98 (d, 1H, Ar-H, J =2.09 Hz), 7.99 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-118	1595(CH) 1673(C=O) 1738(C=O)	4.85 (s, 2H, CH ₂), 5.21 (s, 2H, OCH ₂), 7.16 (dd, 1H, Ar-H, J =7.49Hz), 7.21 (d, 1H, Ar-H, J =8.99 Hz), 7.25 (dt, 1H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =7.79 Hz), 7.36 (dt, 1H, Ar-H, J =2.39 Hz, J =7.79 Hz), 7.34-7.48 (m, 5H, Ar-H), 7.64 (d, 2H, Ar-H, J =8.99 Hz), 7.68 (dd, 1H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =7.79 Hz), 7.95 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-57	1598(CH) 1695(C=O) 1764(C=O)	3.32 (s, 3H, CH ₃), 4.83 (s, 2H, CH ₂), 7.16-7.22 (m, 2H, Ar-H), 7.36-7.41 (m, 2H, Ar-H), 7.88 (d, 2H, Ar-H, J =8.39 Hz), 8.04 (s, 1H, CH=); 8.06 (d, 2H, Ar-H, J =8.39 Hz)
LPSF/GQ-59	1609(CH) 1677(C=O) 1730(C=O)	4.82 (s, 2H, CH ₂), 7.18 (m, 2H, Ar-H), 7.35-7.40 Hz (m, 2H, Ar-H), 7.62 (d, 2H, Ar-H, J =8.99 Hz), 7.67 (d, 2H, Ar-H, J =8.69 Hz), 7.97 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-60	1603(CH) 1685(C=O) 1738(C=O)	3.89 (s, 3H, OCH ₃), 4.81 (s, 2H, CH ₂), 7.15 (d, 1H, Ar-H, J = 8.99 Hz), 7.19 (dt, 2H, Ar-H, J =1.19 Hz, J = 8.69 Hz), 7.39-7.34 (m, 2H, Ar-H), 7.55 (d, 1H, Ar-H, J =2.39 Hz), 7.67 (dd, 1H, Ar-H, J =2.69 Hz, J =8.99 Hz), 7.97 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-61	1587(CH) 1673(C=O) 1730(C=O)	3.97 (s, 3H, OCH ₃), 4.81 (s, 2H, CH ₂), 7.17 (dt, 2H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =8.69 Hz), 7.30 (d, 1H, Ar-H, J =8.69 Hz), 7.39-7.34 (m, 2H, Ar-H), 7.64 (dd, 1H, Ar-H, J =2.09 Hz, J =8.69 Hz), 7.91 (d, 1H, Ar-H, J =2.09 Hz), 7.92 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-62	1603(CH) 1681(C=O) 1738(C=O)	4.84 (s, 2H, CH ₂), 7.19 (dt, 2H, Ar-H, J =1.19 Hz, J =8.99 Hz), 7.42-7.53 (m, 2H, Ar-H), 7.44-7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.74 (d, 2H, Ar-H, J =8.39 Hz), 7.72-7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.88 (d, 2H, Ar-H), 8.02 (s, 1H, CH=)
LPSF/GQ-64	1609(CH) 1688(C=O) 1738(C=O)	3.32 (s, 6H, OCH ₃), 3.34 (s, 3H, OCH ₃), 4.82 (s, 2H, CH ₂), 7.18 (dt, 1H, Ar-H, J =8.69 Hz), 7.35-7.40 (m, 1H, Ar-H), 7.48-7.53 (m, 1H, Ar-H), 7.66 (dd, 1H, Ar-H, J =7.0 Hz), 7.86 (d, 2H, Ar-H, J =1.79 Hz); 7.96 (s, 1H, CH=)

^a DMSO.

Table 3 Viability spleens cell in the presence of the synthesized compounds

Compd.	Viability cell (%) (100 μ M/mL) ^a
LPSF/GQ-113B	94.1 $\pm$ 2.25
LPSF/GQ-92	93.8 $\pm$ 0.34
LPSF/GQ-57	80.6 $\pm$ 1.02
LPSF/GQ-59	72.6 $\pm$ 5.1
LPSF/GQ-60	74.55 $\pm$ 8.1
LPSF/GQ-61	81.98 $\pm$ 0.4
LPF/GQ-64	63.6 $\pm$ 1.78

^a Data are expressed as the mean $\pm$ SE from the dose-response profile of three independent experiments.

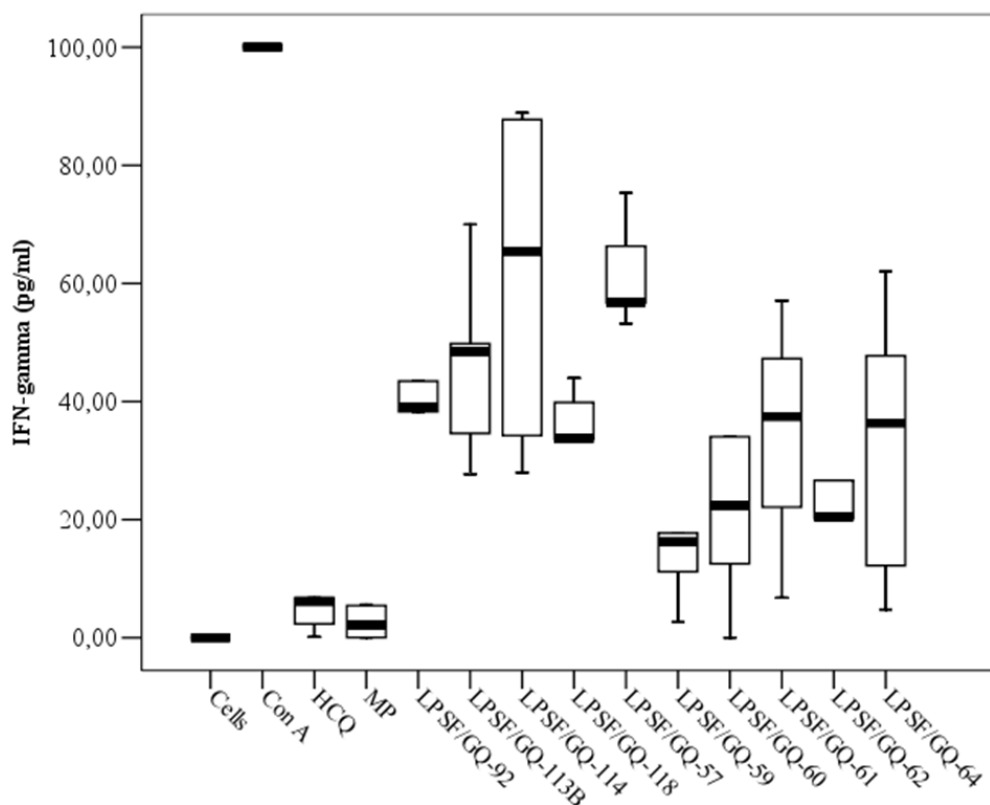
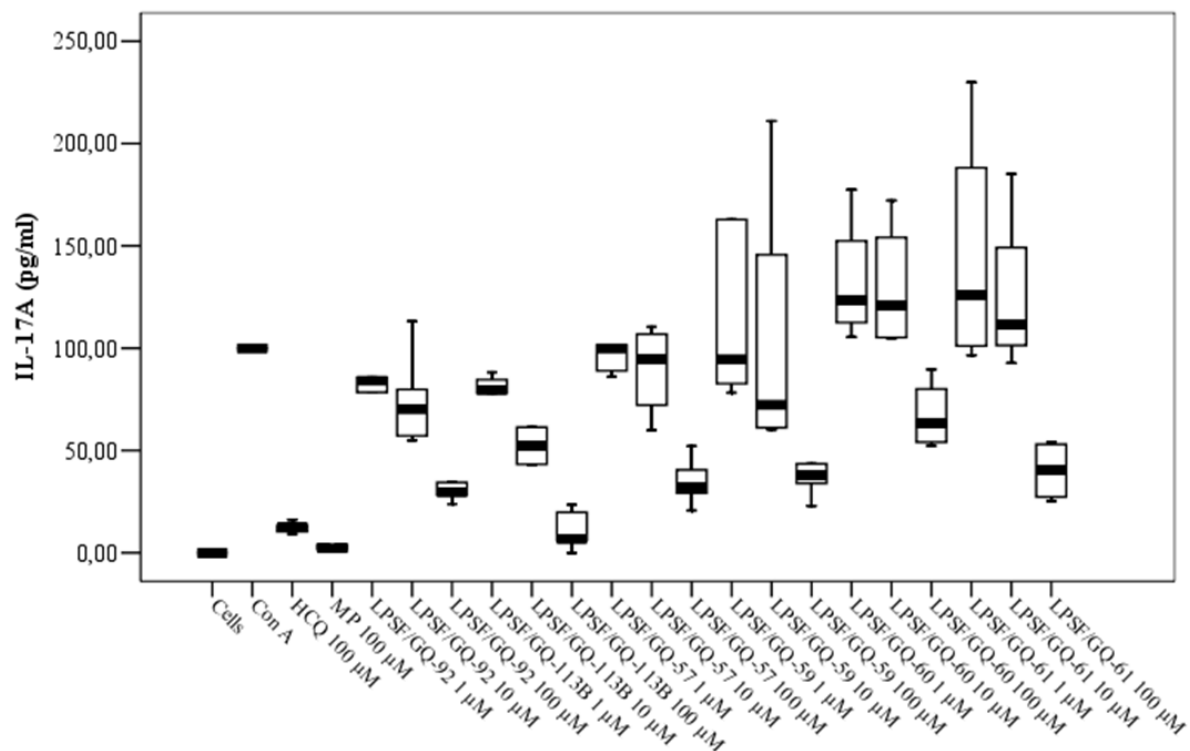


Figure 1. Determination of IFN- γ concentrations in supernatant of the spleen cells. The concentrations of IFN- γ in the cells treated with compounds LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-62, LPSF/GQ-64, LPSF/GQ-92, LPSF/GQ-113B, LPSF/GQ-114 and LPSF/GQ-118 significantly decreased ($p < 0.05$) in the concentration of 100 μ M, compared with control cell.



LPSF/GQ-57, LPSF/GQ-59, LPSF/GQ-60, LPSF/GQ-61, LPSF/GQ-92 and LPSF/GQ-113B significantly ($p < 0.05$) decreased in the concentration of 100 μ M, compared with control cells. All data was expressed relative to larger values.

Table 4. Anti-inflammatory activity of the thiazolidinediones derivatives using the air-pouch model

Compound	R ₁	R ₂	Dose (mg/kg)	PMNL count ^a (10 ⁵ /ml)	% Inhibition ^b (PMNL)
LPSF/GQ-92	2-Br	4-OCH ₃	3	14,80 ± 2,1	62
LPSF/GQ-113B	2-Br	3-Br, 6-OCH ₃	3	13,17 ± 1,0	66
LPSF/GQ-57	3-F	4-SO ₂ CH ₃	3	16,8 ± 0,8	57
LPSF/GQ-59	3-F	4-Cl	3	21,05 ± 1,1	46
LPSF/GQ-60	3-F	3-Br, 6-OCH ₃	3	16,23 ± 0,7	58
LPSF/GQ-61	3-F	3-Br, 4-OCH ₃	3	29,66 ± 4,6	24
LPS/GQ-64	3-F	3,4,5-OCH ₃	3	23,86 ± 1,4	39
Rosiglitazone	-	-	3	10,98 ± 2,0	72
Control	-	-	-	39,06 ± 1.91	-

^a PMNL is the cell infiltration by polymorphonuclear leukocytes. Data points represent the mean PMNL count number per animal group with the corresponding standard error. The presented values are significant (p<0.05) confidence interval (ANOVA, Bonferroni test).

^b The inhibition was determined compared to a control group (untreated).

Artigo II

Artigo 2

Chloroquine and hydroxychloroquine immunomodulatory effect in Th17 pathway

Rheumatology

ISSN: 1462-0332

Impact factor: 4.32

Chloroquine and hydroxychloroquine immunomodulatory effect in Th17 pathway

**SILVA, J.C.^{1,2}; ROCHA JUNIOR, L.F.^{1,3}; DUARTE, A.L.B.P.³; LIMA, M.C.A.²;
MARIZ, H.A.³; PITTA, I.R.^{1,2}; GALDINO, S.L.^{1,2}; *PITTA, M.G.R.¹**

¹Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-910, Brasil

²Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos - Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-910, Brasil

³Hospital das Clínicas de Pernambuco - Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-910, Brasil

* e-mail: mgrpitta@gmail.com

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the immunomodulatory activity of chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ) in Th17 cytokine pathway. Interleukin (IL)-6, IL-17 and IL-22 levels were quantified by ELISA in culture supernatants of concanavalin stimulated spleen cells from BALB / c mice in absence or presence of CQ or HCQ in different concentrations. We also analyzed cytokines levels in culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers (HV) and patients with rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE), after the cells were stimulated PMA / Ionomycin in the absence or presence of CQ or HCQ in different concentrations. Our results demonstrated that spleen cells in the presence of CQ and HCQ significantly inhibited the production of IL-17 in BALB / c mice. In PBMCs from healthy volunteers and patients with SLE and RA also observed a significant reduction in IL-6, IL-17 and IL-22. These results contribute to a better understanding of the mechanism of action of CQ and HCQ and of these compounds as potent adjuvant drugs in the treatment of individuals with autoimmune diseases.

Introduction

For many years, naïve CD4⁺ have been thought to differentiate into two possible lineages. The Th1 and Th2 cells mainly produce interferon- γ (IFN- γ) and IL-4, respectively (1-4). Th17 cells have been described and associated with the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and IL-26 (5-9). In Th17 development process IL-1 β , IL-6, TGF- β induce naïve T cells to Th17 (10-12) and IL-23 has a central role in maintenance of this subset (13-14).

Previous studies suggest a role of Th17 cells in pathogenesis of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA), functions that were previously believed to be mediated by Th1 cells (15-18).

IL-17 production is increased in patients with SLE. This cytokine amplifies the immune response by increasing target organ inflammation and damage and by augmenting the production of antibodies by B cells (19). Interleukin-17A and IL-22 contributes to the pathogenesis of arthritis as has been shown in several experimental arthritis models (20). In addition, evidences show that given the important pathogenic functions of the IL-17 pathway in autoimmune diseases, strategies that specifically block this pathway may provide the next generation of efficacious therapies (21).

Chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ) are a well-known 4-aminoquinoline class of drug that is widely used for the prophylaxis treatment of malaria (22). The anti-inflammatory property of these compounds also makes it a useful agent for the treatment of rheumatoid arthritis (23-25) and systemic lupus erythematosus (26-27)

because they are relatively well tolerated in comparison with other anti-rheumatic agents of similar potency (28-29).

Several studies demonstrate anti-inflammatory activity of CQ and HCQ due to inhibition of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-6, TNF- α and IL-1 β (30-34). Nevertheless, until now no group has evaluated the immunomodulatory role of compounds like CQ and HCQ in the production of cytokines of Th17 pathway. The purpose of this study was to evaluate the effect of CQ and HCQ in the production of cytokines of Th17 pathway in splenocytes from mouse BALB/c and in human PBMC from healthy volunteers, and patients with SLE and RA patients after mitogenic stimulation.

Materials and methods

Compounds

CQ (Chloroquine diphosphate salt, purity 98%), HCQ (Hydroxychloroquine sulphate, purity 98%), 6 α -methylprednisolone, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, purity $\geq 99\%$) in the concentration of 100 ng/ml, ionomycin (Ionomycin calcium salt from *Streptomyces conglobatu*, purity $\geq 98\%$) in the concentration of 1 μ g/ml and ConA (Concanavalin A from *Canavalia ensiformis*, Jack bean) in the concentration of 5 μ g/ml were purchased from Sigma-Aldrich® (Brazil).

Animals

Experimental assays utilized mice BALB/c (male and female, 45 days old). The animals were raised and maintained at the animal facilities of the Laboratory of Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) (University Federal of Pernambuco, Recife, Brazil). The guidelines of the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the University Federal of Pernambuco were followed (23076.019705/2011-83).

Preparation of splenocytes

After killing the animals with CO₂ gas, the spleen of each mouse was removed aseptically and placed in a Petri dish containing RPMI-1640 (Gibco). In a vertical flow, each spleen was transferred to another Petri dish where they were soaked. The cell suspensions obtained from each spleen were filtered in a Cell Strainer 40µm nylon (BD Falcon™) and then transferred to Falcon tubes containing. Spleen homogenates were then centrifuged twice at 300g for 10 min. Cells were then lysed with 1X RBC lysis buffer (eBiosciences). Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%.

PBMCs purification

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized blood from healthy, non-smoking donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sampling was collected, and the PBMC were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Cells were counted in a

Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%.

Splenocytes and PBMCs cultures

Splenocytes and PBMC (1×10^6 cell/well) were cultured in 24-well plates (TPP) in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), HEPES 10 mM (Gibco) and penicillin (10.000 U/ml) / (streptomycin 10.000 μ g/ml) (Gibco). The cells were stimulated or not and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator.

Cytokine titration

Cytokines in the supernatants of cultures were assayed by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions. In cultures supernatants from splenocytes: IL-6 (BD Biosciences), IFN- γ (BD Bioscience), IL-17A (eBiosciences), and IL-22 (eBiosciences) levels were measured at 48 hours. In culture supernatants from PBMCs: IL-6 (BD Biosciences), IFN- γ (BD Bioscience) and TNF- α (BD Bioscience) level was measured at 24 hours, IL-17A (R&D Systems), IL-22 (eBiosciences), and IL-23p19 (eBiosciences) levels were measured at 48 hours. The lower limits of detection for the ELISA analyses were as follows: 15,625 pg/ml for IL-6, IL-22 of mouse, and IL-17 and TNF- α of human; 7,812 pg/ml for IL-17A of mouse; 9,375 pg/ml for IL-6 and IFN- γ of human; and 31, 25 pg/ml for IFN- γ of mouse, IL-23p19 and IL-22 of human.

Study Population

A total of 19 patients with SLE and 13 patients with RA were recruited from the Department of Rheumatology at Hospital das Clinicas of the Universidade Federal de Pernambuco. Current medications were recorded. All the patients were female patients. The diagnosis of SLE and RA were established by the presence of four or more diagnostic criteria of the American College of Rheumatology (ACR) (35-36). About 5 healthy volunteers (Mean age 25 ± 1.64) were included as normal controls, all of them did not have any rheumatologic conditions. Peripheral blood samples were obtained from patients and healthy volunteers. All subjects gave their written consent to participate. The study was approved by the ethics committee of the University Federal de Pernambuco.

Collection of clinical and laboratory data

Demographic, clinical and laboratory data were collected from hospital records or by questionnaire and reviewed by experienced physicians. The tables presents demographic and clinical findings in patients with RA and SLE (Table 1).

Insert table 1

Results

Effect of HCQ and CQ on the synthesis of cytokines of Th17 pathway in splenocytes

To our knowledge no previous study has evaluated the effect antimalarial drugs in the production of IL-17 and IL-22. In our first step we analyzed the effect of CQ and HCQ in

the inhibition of IL-6, IL-17A and IL-22 after stimulation of splenocytes from BALB / c mice with Con A. The levels of IL-6 and IL-22 were below the detection limit of the ELISA kit (<15,625 pg / ml). Con A was able to induce the production of IL-17A in splenocytes, and CQ or HCQ were able to inhibit significantly ($p < 0.05$) this production (Figure 1, Table 2). The maximum production of IL-17A after stimulation with Con A was observed after 48 hours of incubation. Cells treated with doses of 5, 10, 25, 50 and 100 μ M of CQ or HCQ showed significant inhibition ($p = 0.007$ for both) in the levels of IL-17A compared with cells stimulated with Con A only (Figure 1A and 2A, Table 2). In cells treated with the standard composite, methylprednisolone, there was also significant ($p = 0.007$) inhibition of IL-17A.

Insert figure 1

Insert table 2

Effect of HCQ and CQ on the synthesis of cytokines of Th17 pathway in PBMCs from healthy volunteers

We also evaluated the effect of CQ and HCQ on the synthesis of Th17 cytokines (IL 17, IL 22 and IL 23p19) in PBMCs from healthy volunteers after 48 hours of stimulation with PMA / Ionomycin (IL17 Figure 2A, Table 3), IL-22 (Figure 2B, Table 3) and IL-23p19 levels in culture supernatant. Incubation with CQ or HCQ resulted in significant ($p < 0.05$) inhibition, in a dose dependent manner, of the production of IL-17 and IL-22. We were not able to analyze IL-23p19 levels because they were below limit detection of ELISA commercial kit (<31.25 pg/ml). CQ and HCQ at 100 μ M dose induced a complete

inhibition of IL-17 levels ($p=0.007$ to both compounds), decreased IL-22 levels ($p=0.04$ and $p=0.07$, respectively for CQ and HCQ) when compared with controls (Figures 2A and 2B, Table 3). We also observed significant inhibition of IL-17($p <0.05$) in 25 μM concentration ($p=0.015$ for CQ and $p=0.007$ for HCQ) and 50 μM concentration ($p=0.007$ for CQ and HCQ) in cells incubated with CQ and HCQ, compared to control. Interleukin-22 levels were significantly reduced ($p <0.05$) only in cells incubated with 50 μM of CQ and HCQ ($p=0.031$ for both). The doses of 25 μM did not significantly inhibit IL-22 levels in cells treated with CQ and HCQ.

Insert figure 2

Insert table 3

Effect of HCQ and CQ on the synthesis of Th17 related cytokines in PBMCs of SLE and RA patients

After evaluating the results obtained from healthy volunteers, we analyzed the effect of HCQ (concentration of 100 μM) on the Th17 cytokines levels from PBMCs of SLE and RA patients after stimulation with PMA and ionomycin. IL-6, IL-17 and IL-22 presented negligible levels in non-stimulated cells and probably addition of PMA and ionomycin induced a remarkable increase in the level of this cytokines in PBMCs from patients with RA and SLE. We found a significant inhibition of IL-6, IL17 and IL22 levels in either SLE and RA patients in cells incubated with HCQ at a dose of 100 μM compared with cells stimulated only with PMA / Ionomycin IL-6 ($p<0.002$ and $p<0.005$ respectively) (Figures 3A and 4A), IL-17 ($p<0.0000007$ for RA and $p<0.0002$ for SLE) (Figures 3B

and 4B) and IL-22 ($p < 0.0000005$ for RA and $p = 0.011$ for SLE)(Figures 3C and 4C) (Figures 3 and 4, Tables 4 and 5).

Insert figure 3

Insert figure 4

Insert table 4

Insert table 5

Discussion

In the present study, we demonstrate that antimalarial agents chloroquine and hydroxychloroquine decreased pro-inflammatory Th17 cytokines levels in PBMC from healthy individuals, SLE and RA patients and in BALB / c mice splenocytes. We also observed that the inhibition of these secreted cytokines in a dose-dependent manner.

In vitro studies in the literature (32 and 37) have demonstrated inhibition of IFN- γ in spleen cells and monocytes treated with CQ. We observed a significant ($p < 0.05$) inhibition of IFN- γ in a dose dependent manner (data not shown). Other studies have reported that TNF- α and IL-6 production were suppressed in a dose-dependent manner when mouse macrophages, human monocytes and U-937 cells were treated with chloroquine and hydroxychloroquine, but not with other antimalarial drugs after mitogenic stimulation (38, 39 and 33).

In addition, studies reporting the effect of chloroquine and hydroxychloroquine, in PBMCs from healthy volunteers showed that these compounds can inhibit the production

of IL-6 at 100 μ M concentration (30-32). We also observed reduced levels of IFN- γ , IL-6 and TNF- α in cells treated with CQ and HCQ concentration of 100 μ M (data not shown), which confirms potent anti-inflammatory abilities of this agent.

IL-6 is a pleiotropic cytokine that has been implicated in many autoimmune and inflammatory conditions (40-42). The pivotal role of IL-6 in the pathogenesis of SLE and RA had been supported by several experiments (43-44). Hydroxychloroquine, in the dose of 100 μ M, significantly inhibited the levels of IL-6 in PBMCs from patients with SLE and RA. In agreement with previous data, there is evidence that IL-6 plays a central role in the differentiation of Th17 cells. Antimalarial drugs possess inhibitory activity of interleukin 6 and other cytokines.

However, it has not been reported the effect of these agents on inhibiting cytokines such as IL-17 and IL-22. We observed that CQ and HCQ also have inhibitory activity in IL-17 in splenocytes, even at low doses. To enhance the inhibitory effect of both compounds in mononuclear cells from healthy volunteers we also demonstrated decreased levels of IL-17 and IL-22, more significantly in the concentration of 100 μ M. When we evaluated the effect of hydroxychloroquine in PBMCs of patients with SLE and RA, we noted that the analogue of chloroquine also has inhibitory action of IL-17 and IL-22.

Conclusion

Given the pathogenic role of IL-17 pathway in several autoimmune diseases, strategies that specifically block this pathway may provide more effective therapies. Our

in vitro results demonstrated that CQ and HCQ inhibit the production of IL-17 and IL-22. In this context, we strengthen the potent anti-inflammatory activity of these antimalarial agents, contributing to a better understanding of the effect of these compounds. This work also reinforces the role of CQ and HCQ in the treatment of individuals with autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.

Acknowledgement

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia (FACEPE), for financial support.

References

1. Hsieh C S, Macatonia S E, Tripp C S, Wolf S F, O'Garra A, Murphy, K M. Development of Th1CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260:547–549.
2. Schariton T M, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell sub- sets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 1993; 178:567–577.

3. Shinkai K, Mohrs M, Locksley, R M . Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*. 2002; 420:825–829.
4. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan E S, Urban J F, Dvorak A M, Finkelman F D, LeGros G, Paul W E. Basophils produce IL 4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 507–517.
5. Langrish C L, Chen Y, Blumenschein W M, Mattson J, Basham B, Sedgwick J D. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; 2: 233–40.
6. Park H, Li Z, Yang X O, Chang S H, Nurieva R, Wang Y H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 2005; 6:1133-1141.
7. Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Res* 2006; 16:902–7.
8. Liang S C, Tan X Y, Luxenberg D P, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 2006; 10:2271–9.

9. McGeachy, M J, Cua D J. Th17 cell differentiation: The long and winding road. *Immunity* 2008; 28:445–453.
10. Veldhoen M, Hocking R J, Atkins C J, Locksley R M, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179–89.
11. Mangan P R, Harrington L E, O’Quinn D B, Helms W S, Bullard D C, Elson C O, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231–4.
12. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 7090: 235–8.
13. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27:485–517.
14. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 2473–83.
15. Ouyang W, Kolls J K, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008; 28: 454-467.

16. Nalbandian A, Crispín J C, Tsokos G C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts Clinical and Experimental Immunology. 2009; 157: 209–215.
17. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members Immunity. 2011; 34:149-162.
18. Van de Veerdonk F L, Gresnigt M S, Kullberg B J, Van der Meer J W M, Joosten L A B, Netea M G. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview BMB reports. 2009; 42: 776-787.
19. Crispin J C, Tsokos G C. IL-17 in Systemic Lupus Erythematosus. Journal of Biomedicine and Biotechnology (2010). DOI:10.1155/2010/943254.
20. Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. Semin. Immunopathol.2010; 32:43–53.
21. Hu Y, Shen F, Crellin N K, Ouyang W. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2011; 1217: 60–76.
22. Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New antimalarial drugs. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2003; 42: 5274–5293.

23. Augustijns P, Geusens P, Verbeke N. Chloroquine levels in blood during chronic treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1992; 42: 429–433.
24. Titus E O. Recent developments in the understanding of the pharmacokinetics and mechanism of action of chloroquine. *Ther. Drug Monit.* 1989; 11: 369–379.
25. Smolen J S, Landewé R, Breedveld F C, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gossec L, Huizinga T, Bijlsma J W, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Gomez-Reino J, Kouloumas M, Kvien T K, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott D L, Sokka T, Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde D. 2010. EULAR recommendations for the management of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010;69:964–975. DOI: 10.1136/ard.2009.126532.
26. Meinao I M, Sato E I, Andrade L E, Ferraz M B, Atra E. Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1996; 5: 237–241.
27. Borba E F, Latorre L C, Brenol J C T, Kayser C, Silva N A, Zimmermann A F, Padua P M, Costallat L T L, Bonfa E, Sato E I. Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2008; 48:196-207.

28. Felson D T, Anderson J J, Meenan R F. The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1449–61.
29. HERA study group. A randomized trial of hydroxychloroquine in early rheumatoid arthritis: the HERA study. *Am J Med* 1995; 98:156–68.
30. Jang C H, Choi J H, Byun M S, Jue D M. Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology*. 2006; 45: 703–710.
31. Karres I, Kremer J P, Dietl I, Steckholzer U, Jochum M, Ertel W. Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *Am. J. Physiol.* 1998; 274:1058-1064.
32. Van den Borne B E, Dijkmans B A, de Rooij H H, Le Cessie S, Verweij C L. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor- α , interleukin 6, and interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells. *J. Rheumatol.* 1997; 24:55-60.
33. Jeong J Y, Choi J W, Jeon K I, Jue D M. Chloroquine decrease cell-surface expression of tumor necrosis factor receptors in human hytiocitic U-937 cells. *Immunology*. 2002; 105: 83-91.

34. Wozniacka A, Lesiak J B, Smolarczyk K, McCauliffe D P, Jedrzejowska A S. The influence of antimalarial treatment on IL-1b, IL-6 and TNF- α mRNA expression on UVB-irradiated skin in systemic lupus erythematosus. *British Journal of Dermatology*. 2008; 159: 1124–1130.
35. Arnett F C, Edworthy S M, Bloch D A, McShane D J, Fries J F, Cooper N S. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315-324.
36. Hochberg M C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40:1725.
37. Gumed B, Waako B J, Folb P I, Ryffel B. Modulation of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-12 Production by Artesunate in Mitogen Treated Splenocytes. *International Journal of Tropical Medicine*. 2009; 4: 65-69.
38. Picot S, Peyron F, Donadille A, Vuillez J P, Barbe G, Thomas P A. Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. *Immunology*. 1993; 80:127-133.

39. Jeong J Y, Jue D M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages J. Immunol. 1997; 158: 4901-7.
40. Schett G. Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. Autoimmunity, May 2008; 41: 224–229.
41. Hashizume M, Mihara M. The Roles of Interleukin-6 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Arthritis. 2011. DOI: 10.1155/2011/765624.
42. Ohl K, Tenbrock K. 2011. Inflammatory Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. J. Biomed. Biotechnol. 2011. DOI: 10.1155/2011/432595.
43. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. Curr. Opin. Rheumatol. 2006; 18: 277-81.
44. Yap D Y H, Lai K N. Cytokines and Their Roles in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus: From Basics to Recent Advances. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010. DOI: 10.1155/2010/365083.

Figures and Tables

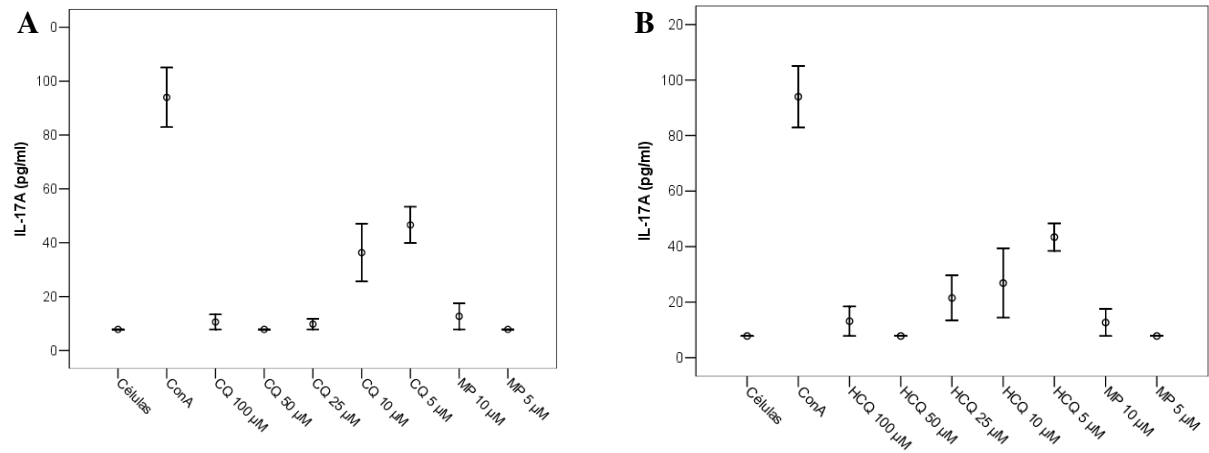


Figure 1. Inhibition of the production of IL-17A by CQ (A) and HCQ (B) at doses of 5, 10, 25, 50, 100 μ M in spleen cells from BALB / c mice.

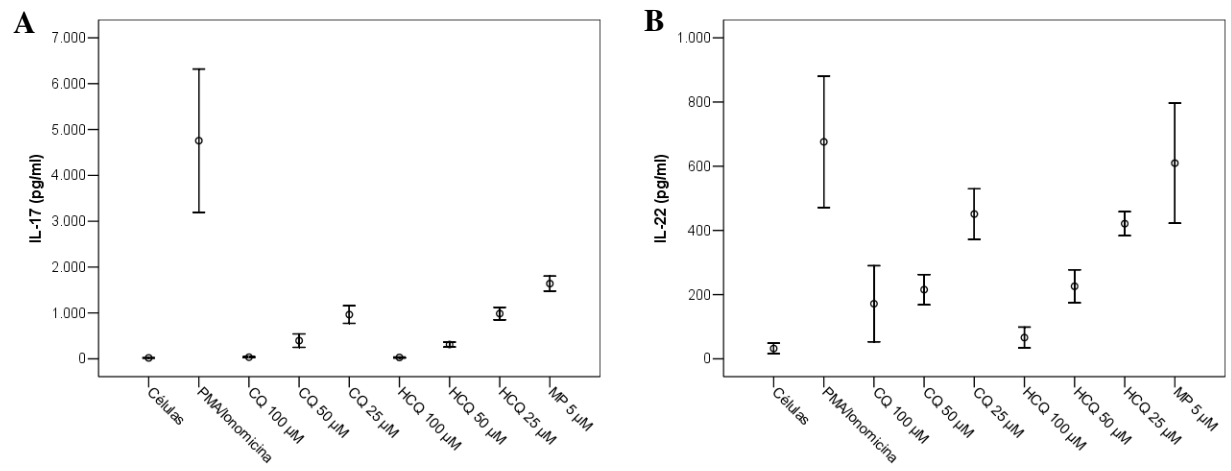


Figure 2. Inhibition of production of IL-17 (A) and IL-22 (B) by CQ and HCQ at doses of 25, 50, 100 μ M in PBMCs from healthy volunteers.

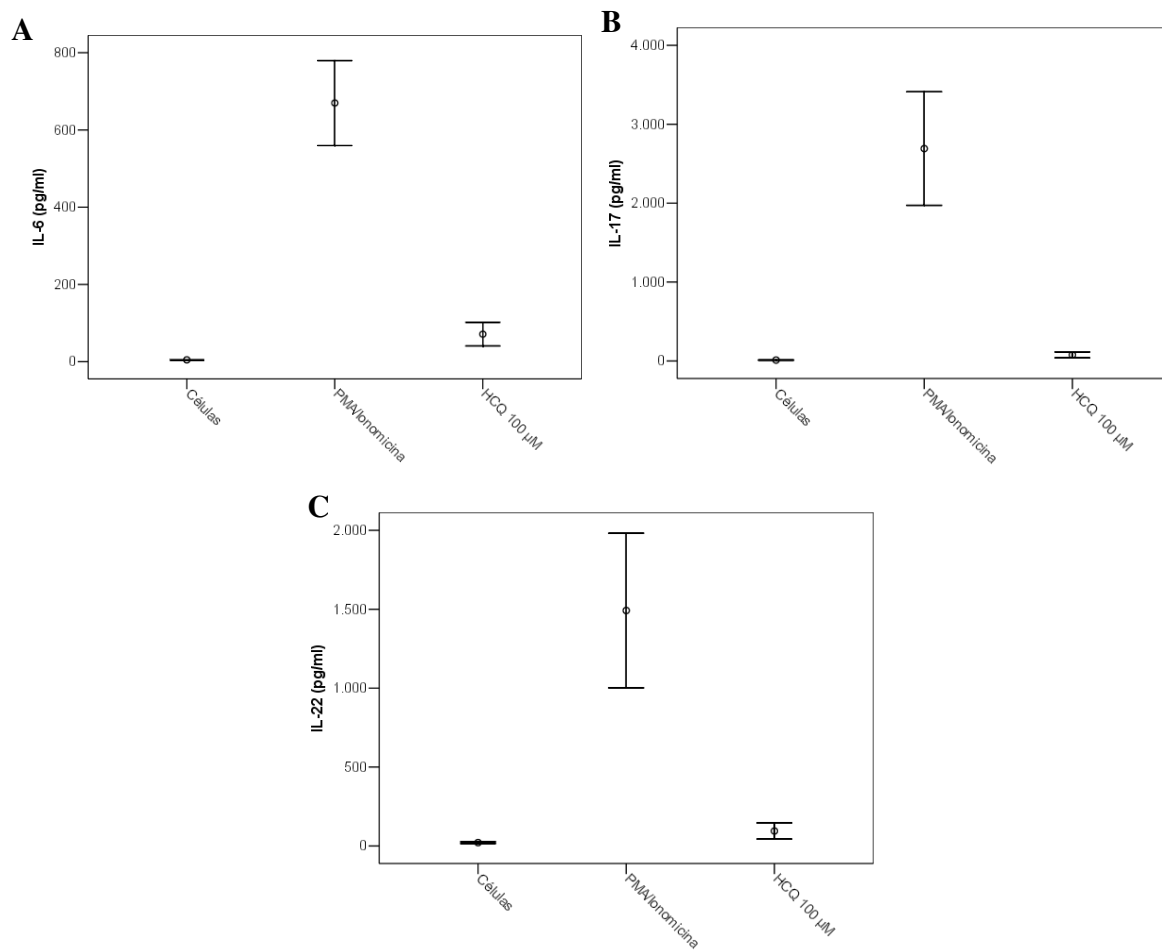


Figure 3. Inhibition of the production of IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-22 (C) of the HCQ at dose of 100 µM in PBMCs from RA patients.

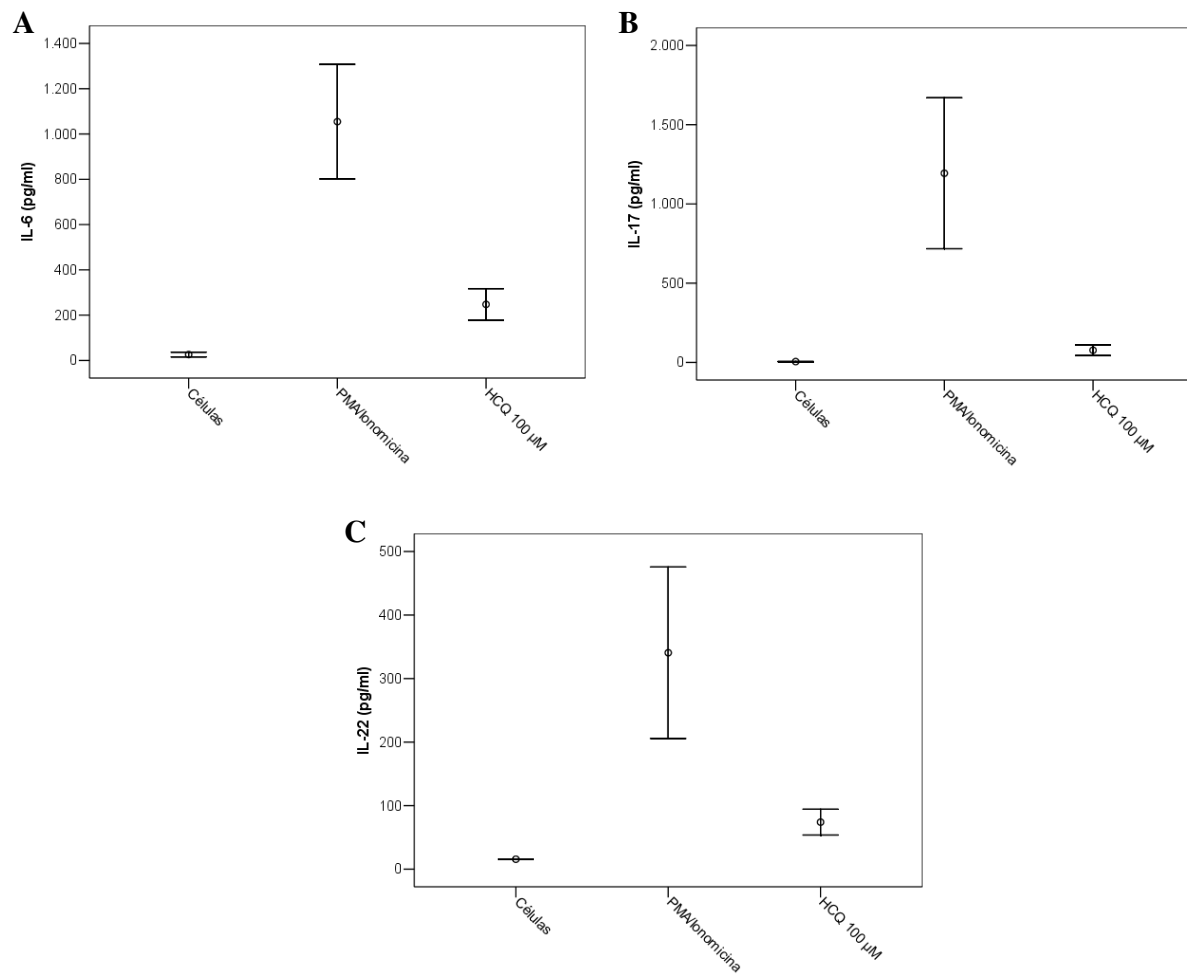


Figure 4. Inhibition of production of IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-22 (C) of the HCQ at dose of 100 µM in PBMCs from SLE patients.

Table 1. Demographic, clinical and current drugs of the patients with RA and SLE		
Diagnostic	SLE	RA
Number of patients	19	13
Age in years: mean (rage)	39(22-61)	51.5(40-69)
Sex (female)	18	13
Disease duration in years: mean (range)	10.9(0,1-40)	8.1(0.8-29.6)
Treatment N(%)		
NSAIDS*	-	1(8%)
Steroids	12(67%)	10(77%)
Antimalarial agents	10(55%)	3(23%)
Methotrexate	-	7(53.8%)
Leflunomide	-	4(30.8%)
Azathioprine	4(22%)	-
Mycophenolate Mofetil	1(5%)	-
Thalidomide	1(5%)	-

*Non-steroidal anti-inflammatory drugs

Table 2. Levels of IL-17A in culture supernatants of splenocytes from BALB / c

Compound	Dose (μ M/ml)	*IL-17A (pg/ml) $\pm$ SD
Chloroquine	5	42.57 $\pm$ 26.89
	10	40.63 $\pm$ 46.41
	25	12.65 $\pm$ 6.85
	50	7.81 $\pm$ 0
	100	14.7 $\pm$ 9.74
Hydroxychloroquine	5	41.75 $\pm$ 21.33
	10	38.76 $\pm$ 43.77
	25	29.60 $\pm$ 30.82
	50	7.81 $\pm$ 0
	100	21.10 $\pm$ 18.80
Methylprednisolone	5	7.81 $\pm$ 0
	10	19.95 $\pm$ 17.17
Con A	5 μ g/ml	104.45 $\pm$ 45.32

* All values were significant (p <0.05) when compared to control cells stimulated with ConA only

Table 3. Levels of IL-17A in PBMCs from healthy volunteers			
Compound	Dose (μM/ml)	*IL-17A (pg/ml) ± SD	*IL-22 (pg/ml) ± SD
Chloroquine	25	1066.45 ± 825.08	514.99 ± 293.89
	50	546.05 ± 569.53	232.40 ± 168.25
	100	39.35 ± 44.61	56.71 ± 58.11,
Hydroxychloroquine	25	899.69 ± 554.96	449.37 ± 156.89
	50	315.45 ± 230.99	233.74 ± 205.50
	100	38.17 ± 42.93	94.61 ± 111.71
Methylprednisolone	5	1578.75 ± 496.14	1172.81 ± 789.0
PMA / Ionomycin	100 ng/ml / 1 μg/ml	5650.63 ± 5865.26	879.06 ± 804.33

* All values were significant (p <0.05) when compared to control cells stimulated with Con A only, except of the dose of 25 μM of the cells incubated with CQ and HCQ to IL-22 and in the cells incubated with the standard compound of the dose of 5 μM to IL-17 and IL-22.

Table 4. Levels of cytokines in PBMCs from patients with RA				
Compound	Dose (μM/ml)	*IL-6 (pg/ml) ± SD	*IL-17 (pg/ml) ± SD	*IL-22 (pg/ml) ± SD
Hydroxychloroquine	100	188.00 ± 259.79	219.95 ± 300.02	316.60 ± 425.67
PMA / Ionomycin	100 ng/ml / 1 μg/ml	2462.06 ± 3456.25	3648.50 ± 4685.99	2464.30 ± 437.52

* All values were significant (p <0.05) compared with control cells stimulated with PMA and Ionomycin only.

Table 5. Levels of cytokines in PBMCs from patients with SLE				
Composto	Dose	*IL-6	*IL-17	*IL-22
	(μM/ml)	(pg/ml) $\pm$ DP	(pg/ml) $\pm$ DP	(pg/ml) $\pm$ DP
Hydroxychloroquine	100	531.90 $\pm$ 745.72	223.70 $\pm$ 310.84	159.48 $\pm$ 203.48
PMA / Ionomycin	-	1466.45 $\pm$ 1933.01	3452.83 $\pm$ 863.71	1313.10 $\pm$ 1834.94

* All values were significant (p <0.05) compared with control cells stimulated with PMA and Ionomycin only

Artigo III

Artigo 3

Decreased serum interleukin 27 in Brazilian systemic lupus erythematosus patients

Lupus: An International Journal

ISSN: 0961-2033

Impact factor: 2.59

TITLE

Decreased serum interleukin 27 in Brazilian systemic lupus erythematosus patients

Ângela Luzia Branco Pinto Duarte¹, Henrique de Ataíde Mariz^{1,2}, Flaviana Alves dos Santos², Andréa Tavares Dantas^{1,2}, Juliana Cruz da Silva², Laurindo Ferreira da Rocha Junior^{1,2}, Suely Lins Galdino³, Maira Galdino da Rocha Pitta².

¹Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

²Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

³Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Abstract

The immunological role of interleukin 27 has been reported in various inflammatory diseases, but its importance in systemic lupus erythematosus pathogenesis is not completely established. The aim of this study was to evaluate serum levels of IL-27 in SLE patients and its correlation with clinical manifestations and disease activity. IL-27 levels were assessed in 70 SLE patients and 30 healthy controls by ELISA. Clinical and laboratory parameters were recorded. The IL-27 serum levels were significantly decreased in SLE patients compared with controls (mean 899.92 pg/ml and 1531.22 pg/ml, $p=0.0004$). There was no association of serum IL-27 levels with disease activity evaluated by SLEDAI score, but there was a trend towards lower levels of IL-27 in patients with active disease (mean 843.35 pg/ml vs 916.69 pg/ml, $p=0.624$) and anti-DNAbs positive patients (mean 584.13 pg/ml vs 971.95 pg/ml, $p=0.073$). There was no difference in IL-27 levels between patients with and without nephritis (mean 916.22 pg/ml vs 886.75 pg/ml, $p=0.89$). These data suggest that IL-27 is implicated in SLE pathophysiology and it seems to have an anti-inflammatory effect, but further studies are needed to clarify the precise role of this cytokine and its potential use as therapeutic target.

Keywords

systemic lupus erythematosus; interleukin 27; nephritis

CORRESPONDING AUTHOR: Máira Galdino da Rocha Pitta, UFPE, Centro de Ciencias Biologicas, Departamento de Bioquimica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitaria, Recife – PE, 50670-901, Brazil. Email: mgrpitta@gmail.com.

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease of unknown etiology that affects mainly young women. Pathologic hallmarks of lupus are an increased autoantibody production, complement activation and immune complex deposition, leading to tissue and organ damage. Recently, it has been demonstrated that cytokine-mediated immunity plays a crucial role in the pathogenesis of SLE ¹.

Interleukin 27 (IL-27) is a heterodimeric member of IL-12 cytokine family, which consists of two subunits: an IL12p40-related protein, encoded by the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3 (EBI3, also known as IL27), and a unique IL12p35-like protein, IL27p28 ². IL-27 receptor complex is constituted of IL-27R (also known as WSX-1) and glycoprotein 130 (gp130) and both components were found to be co-expressed in a wide range of immune cells including monocytes, B cells and T cells ². The role of IL-27 in the immune response is not fully understood, since pro- and anti-inflammatory responses were described. Some studies reported that IL-27 could promote naive CD4⁺ T cells to differentiate into Th1 cells through an increase of IFN γ production ²; Furthermore, there is some evidence that IL-27 has immunosuppressive functions: it suppresses IL-2 production by CD4⁺ T cells ³, inhibits differentiation of Th17 cells ⁴ and promotes IL-10 production by CD4⁺ T cells ⁵.

There are few studies that evaluated IL-27 serum levels in autoimmune rheumatic patients. Raised serum IL-27 levels have been showed in some inflammatory diseases like rheumatoid arthritis ⁶, systemic sclerosis ⁷ and psoriasis ⁸. The role of IL-27

in SLE pathogenesis is not yet established. Thus, the aim of this study was to evaluate serum levels of IL-27 in SLE patients and its correlation with clinical manifestations and disease activity.

Materials and methods

Patients and controls

Seventy Brazilian patients with SLE (3 men and 67 women, mean age 37.8 ± 9.4 years) were recruited from Rheumatology Division at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. All patients included in the study fulfilled four or more of the American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE⁹ and answered a clinical questionnaire from which demographic, clinical and laboratorial data were collected (Table 1). Additional information was obtained from hospital records and reviewed by experienced physicians. Disease activity was evaluated by SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) and active disease was defined by a score of 6 or higher¹⁰. Patients were also classified as active lupus nephritis if they scored at least one of specific renal fields such as proteinuria, urinary casts, haematuria and pyuria. Thirty healthy individuals (20 men and 10 women, mean age 34.9 ± 9.9 years) were also included as a control group.

Peripheral blood samples were obtained from all subjects and serum was separated immediately and frozen at -20°C until use. Tests for anti-dsDNA and serum complement (C3, C4 and CH50) were conducted by standard methods.

All subjects signed a consent form approved by Ethical Committee of Universidade Federal de Pernambuco – Brazil.

INSERT TABLE 1

Measurement of serum IL-27 levels

Serum IL-27 concentrations were determined by specific ELISA kits according to the manufacturer's recommendation (R&D Systems). Each sample was tested in duplicate.

Statistical analysis

Associations of serum IL-27 levels with clinical and laboratory parameters of SLE patients were analyzed by univariate comparisons using nonparametric tests (Mann-Whitney tests). $P < 0.01$ was considered as indicating a significant association and $P < 0.05$ as a suggestive association. The results are shown considering the mean value. All quantitative data were plotted with Graph Prism 3.02 software.

Results

SLE patients presented significantly lower levels of serum IL-27 than healthy controls (mean 899.92 pg/ml and 1531.22 pg/ml, $p=0.0004$) (Figure 1). There was no association of serum IL-27 levels with disease activity evaluated by SLEDAI score using cut-off ≥ 6 ($p=0.624$), but there was a trend towards lower levels of IL-27 in active patients (mean 843.35 pg/ml vs 916.69 pg/ml) (Figure 2A). In addition, IL-27 also

presented lower levels in the anti-dsDNA positive patients (mean 584.13 pg/ml) when compared with the anti-dsDNA negative group (mean 971.95 pg/ml), not statistically significant ($p=0.073$) (Figure 2B). There was no difference in IL-27 levels between patients with and without nephritis (mean 916.22 pg/ml vs 886.75 pg/ml, $p=0.89$).

INSERT FIGURE 1

INSERT FIGURE 2

Discussion

The present study showed that IL-27 levels are significantly decreased in SLE patients compared to healthy controls. Indeed, we find slightly lower IL-27 levels in patients with active disease and with positive anti-dsDNA but it lacked statistical significance.

Recently, a Chinese study with 56 new-onset SLE patients also showed lower serum IL-27 levels in SLE patients specially in patients with lupus nephritis compared to healthy controls ¹¹. In our study, we found a trend towards lower IL-27 levels in active lupus and anti-dsDNA positive patients, but not statistically significant. In line with these findings experimental studies using MRL/lpr mice suggest the immunosuppressive effect of IL-27 in SLE pathophysiology ¹². This study also demonstrated that transgenic overexpression of the WSX-1 gene in MRL/lpr mice resulted in suppressing the development of glomerulonephritis, with improvement in renal function, reduction of proteinuria, decreased anti-dsDNA production and increased survival rate. Our study did

not demonstrate an association with nephritis, however only fourteen patients had active nephritis.

On the other hand, WSX-1 or EBI-3 deficient MRL/lpr mice showed a change in the type of immune response developed, with the development of membranous glomerulonephritis (GN) with Th2-type Ig deposition rather than proliferative diffuse GN, which presents Th1-type deposition^{13,14}. This confirms the role of IL-27 in promoting Th1 response, increasing its pro-inflammatory function. A recent study reported that SLE patients have a higher urinary IL-27 expression than healthy controls and IL-27 expression was inversely correlated with the SLEDAI score. Besides, after six months of treatment, urinary IL-27 expression was higher in patients with complete response but remained unchanged in those with partial or no response¹⁵.

Enhanced expression of IL-27 and its correlation with disease severity have been evaluated in other autoimmune diseases. Patients with rheumatoid arthritis have elevated IL-27 levels and this was associated with disease activity and interstitial lung disease⁶. In systemic sclerosis patients, serum IL-27 levels are elevated and correlate positively with the extent of skin involvement and pulmonary fibrosis⁷. In the same way, psoriatic patients have higher IL-27 levels and these levels have association with disease severity and IFN- γ levels, although in patients with established disease IL-27 suppress proinflammatory factors in the presence of TNF- α ⁸. These findings emphasize the controversial role of IL-27 in autoimmune regulation. It is not clear whether the increase of IL-27 levels indicates its pro-inflammatory role leading to the activation Th1 cells or it reflects a regulatory mechanism to limit Th17 cells activity.

One of the limitations of our study is that some patients included were in regular use of steroids and/or immunosuppressive drugs and this represents a possible confounding effect. Therefore, further studies with a higher sample of patients with active disease and nephritis are needed to comprehend the role of IL-27 in SLE pathogenesis.

In conclusion, our study suggests that IL-27 might be implicated in SLE pathophysiology and it seems to have an anti-inflammatory effect, but the literature remains inconclusive. Since few studies evaluated IL-27 in human and animal models of SLE, future research is needed to clarify the precise role of this novel cytokine and its potential use as therapeutic target.

Funding

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Financiadora de Estudos e Projetos(FINEP).

References

1. Yap DY, Lai KN. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:365083.
2. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002;16(6):779-790.

3. Villarino AV, Stumhofer JS, Saris CJ, Kastelein RA, de Sauvage FJ, Hunter CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol* 2006;176(1):237-247.
4. Liu H, Rohowsky-Kochan C. Interleukin-27-mediated suppression of human Th17 cells is associated with activation of STAT1 and suppressor of cytokine signaling protein 1. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31(5):459-469.
5. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1380-1389.
6. Shen H, Xia L, Xiao W, Lu J. Increased levels of interleukin-27 in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63(3):860-861.
7. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, et al. Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann Rheum Dis* 2011;70(1):194-200.
8. Shibata S, Tada Y, Kanda N, et al. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010;130(4):1034-1039.
9. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
10. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29(2):288-291.
11. Li TT, Zhang T, Chen GM, et al. Low level of serum interleukin 27 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Invest Med* 2010;58(5):737-739.
12. Sugiyama N, Nakashima H, Yoshimura T, et al. Amelioration of human lupus-like phenotypes in MRL/lpr mice by overexpression of interleukin 27 receptor alpha (WSX-1). *Ann Rheum Dis* 2008;67(10):1461-1467.
13. Shimizu S, Sugiyama N, Masutani K, et al. Membranous glomerulonephritis development with Th2-type immune deviations in MRL/lpr mice deficient for IL-27 receptor (WSX-1). *J Immunol* 2005;175(11):7185-7192.
14. Igawa T, Nakashima H, Sadanaga A, et al. Deficiency in EBV-induced gene 3 (EBI3) in MRL/lpr mice results in pathological alteration of autoimmune glomerulonephritis and sialadenitis. *Mod Rheumatol* 2009;19(1):33-41.

15. Kwan BC, Tam LS, Lai KB, et al. The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(12):1491-1497.

Table 1. Demographic, clinical and laboratory findings in SLE patients

Number of patients	70
Age (yrs)	
Mean (range)	37.8 ± 9.5 (20-61)
Sex	N(%)
Female	67 (95.7)
Male	03 (04.3)
Disease duration (mo)	
Mean (range)	124.9 (1-480)
Anti-dsDNA	N(%)
Positive	13 (18.6)
Negative	57 (81.4)
Complement	N(%)
Decreased	43 (61.4)
Normal	27 (38.6)
Treatment	N(%)
Steroids	54(77.1)
Antimalarial agents	41(58.6)
Azathioprine	22(31.4)
Micophenolate mofetil	05(7.1)
Thalidomide	02(2.9)
Disease activity (SLEDAI)	N(%)
< 6	54 (77.1)
≥ 6	16 (22.9)
Nephritis	N(%)
Active	14 (20.0)
Inactive	56 (80.0)

Figure 1. Serum IL-27 levels in SLE patients and controls (p=0.0004).

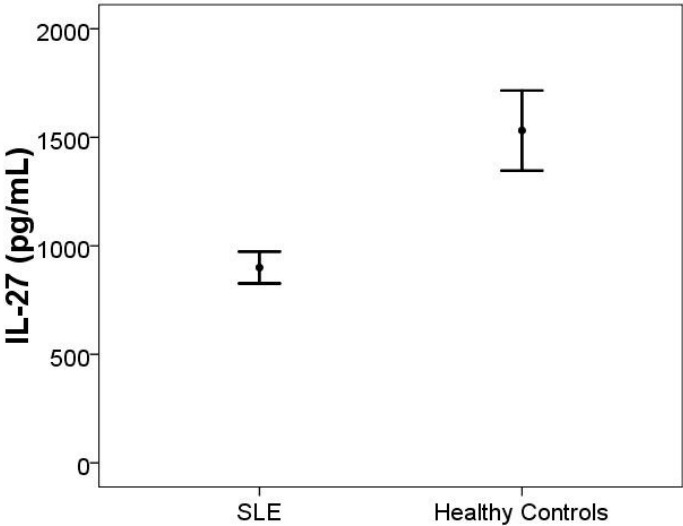
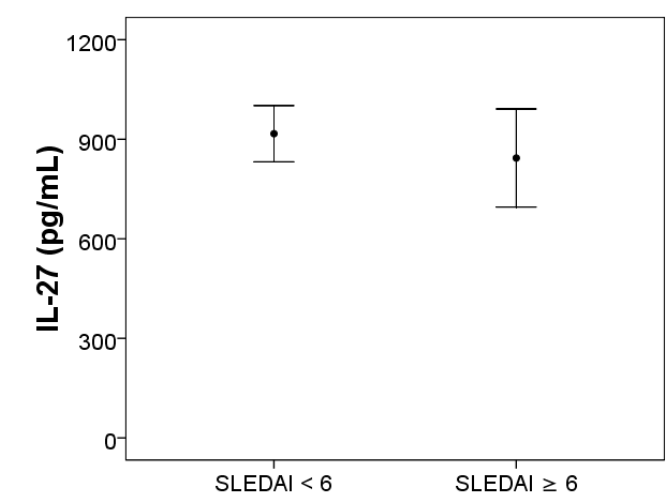
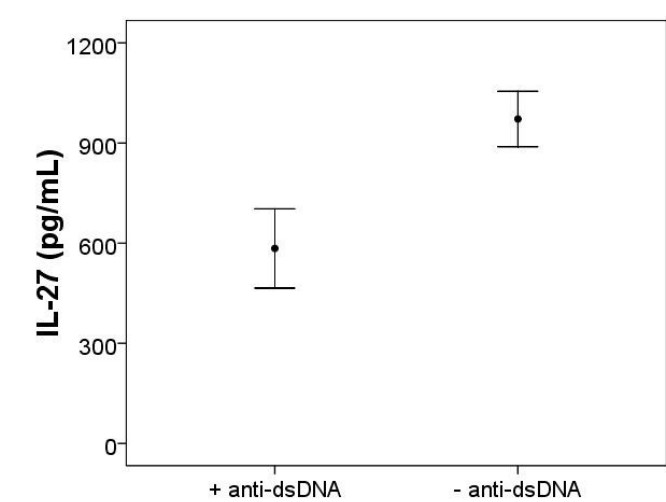


Figure 2: Association of serum IL-27 levels with disease activity evaluated by SLEDAI score ($p=0.624$) (**A**), and anti-dsDNA positivity ($p=0.073$) (**B**) in SLE patients.

A



B



Conclusões

7. Conclusões

- Foram obtidos dez novos compostos tiazolidínicos 3,5-disubstituídos das séries 5-benzilideno-3-(2-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ) e 5-benzilideno-3-(3-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ);
- Os compostos tiveram suas estruturas comprovadas pela análise de seus espectros de RMN¹H, I.V e MS;
- A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi investigada e verificou-se que os compostos avaliados apresentaram atividade de inibição da produção de IFN γ e IL-17A em esplenócitos de BALB/c após estimulação com Com A;
- A atividade anti-inflamatória *in vivo* foi avaliada no modelo de “air-pouch” induzido por carragenina em camundongos. Os resultados demonstraram que os compostos apresentaram caráter inibidor da resposta inflamatória induzida por carragenina com percentuais de inibição de migração celular entre 24 e 66% na dose de 3 mg/kg.
- Foi realizada a avaliação imunomoduladora da cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ) diante da via Th17 pela quantificação das citocinas IL-6, IL-17 e IL-22.
- Os resultados observados demonstraram que estes antimaláricos possuem atividade inibição da produção de IL-17 em esplenócitos após estimulação mitogênica;
- Foi observado em voluntários sadios a capacidade de inibição da síntese de IL-17 e IL-22 nas células incubadas com CQ e HCQ após estimulação com PMA/Ionomicina;
- Nas PBMCs provenientes de pacientes com LES ou AR, houve inibição da produção de IL-6, IL-17 e IL-22 após estimulação com PMA/Ionomicina;

- Os resultados da correlação de IL-27 e LES demonstraram que há menores quantidades de IL-27 em pacientes portadores de LES;

Perspectivas

8. Perspectivas

Temos como perspectivas estudos mais específicos a fim de elucidar o mecanismo de ação dos novos derivados da tiazolidinas-2,4-dionas sintetizados e avaliados biologicamente. Entre esses estudos, a investigação de citocinas participantes da via Th17 presentes em sobrenadantes de cultura de PBMCs provenientes de voluntários sadios e, posteriormente, de PBMCs provenientes de portadores de doenças autoimunes. Em paralelo, faz-se necessário a realização de ensaios farmacológicos *in vivo* de analgesia, toxicidade aguda e investigação de mediadores anti-inflamatórios com o objetivo da otimização dessa série de compostos.

A fim de contribuir com melhores entendimentos sobre o efeito imunomodulador dos antimaláricos na via Th17 temos como perspectivas a avaliação em pacientes portadores de outras doenças autoimunes, como psoríase e alergias. Ainda, os estudos devem ser continuados em experimentos *in vivo*, visto que há poucos trabalhos com modelos animais que avaliam a atividade anti-inflamatória da cloroquina e hidroxicloroquina;

Para que a correlação entre IL-27 e LES seja mais estudada, a determinação dessa citocina deverá ser investigada em sobrenadantes de cultura de PBMCs de voluntários sadios e de pacientes portadores de LES ou AR;

Anexos

8. Anexos

8.1. Metodologias Aplicadas

8.1.2. Síntese dos Compostos

Para obtenção dos novos derivados propostos neste trabalho foram utilizados reagentes e solventes que apresentaram a especificação P.A. provenientes das marcas Acros Organics, Sigma/Aldrich, Merck, Riedel-De Haën e Vetec. Os reagentes e solventes utilizados foram: ácido cloroacético, tiouréia, acetato de etila; benzeno; cianoacetato de etila; etanol; *n*-hexano; piperidina; brometo de 2-bromobenzil; benzaldeídos substituídos; hidróxido de potássio.

Na cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F₂₅₄, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo.

A caracterização estrutural foi realizada através da espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), em espectrofotômetro FTIR Bruker Modelo IFS 66, pastilhas de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) foram efetuados em espectrofotômetro Varian Modelo Plus 300 MHz. Os espectros de massas foram registrados sobre impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro R1010C Delsi-Nermag, acoplado a CPG HP5890. Para determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho Quimis Modelo 340.27.

A metodologia de síntese dos derivados das séries 5-benzilideno-3-(2-bromobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ) e 5-benzilideno-3-(3-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ) foi realizada através de via plana e convergente obtendo substituições nas posições 3 e 5 do núcleo tiazolidina-2,4-diona.

8.1.2.2. Síntese da tiazolidina-2,4-diona

Em um balão de fundo redondo foi adicionado em quantidades equimolares a tiouréia e o ácido monocloroacético em solução aquosa. A mistura foi aquecida à de 60°C

durante 18 horas. Em seguida, o produto obtido foi cristalizado por resfriamento. Obtiveram-se cristais brancos referentes a tiazolidina-2,4-diona, cuja purificação foi realizada através de cristalizações em água destilada (LIBERMAN et al., 1948 *apud* LIMA, 1998).

8.1.2.3. Método Geral de Síntese dos Derivados 3-(2-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-54) e 3-(3-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-56)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados a tiazolidina-2,4-diona e uma solução hidroalcoólica (EtOH/H₂O 7:3) de hidróxido de sódio, deixando reagir a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado, o haleto de alquila correspondente. Aqueceu-se a mistura reacional lentamente até atingir 70°C. Todas as reações foram acompanhadas por análise de cromatografia em camada delgada (CCD) (DAVIS e DAINS, 1935 *apud* LIMA, 1998). Os compostos obtidos foram purificados por lavagens com os solventes apropriados (UCHÔA, 2004).

8.1.2.4. Método Geral de Síntese dos Ésteres 2-Ciano-3-fenil-acrilatos de etila (LPSF/IP)

Em um balão de fundo redondo acoplado a um sistema Dean-Starck foram adicionados benzaldeídos substituídos, cianoacetato de etila, piperidina como catalisador e tolueno como solvente. A mistura foi aquecida a 110 °C e os cristais foram obtidos, após evaporação dos solventes (COPE et al., 1941). Os compostos obtidos foram purificados por recristalizações seguidas de lavagens com solventes adequados (OGATA e TSUCHIDA, 1959 *apud* KABICKY, 1961; COUTO, 2006; PEREIRA, 2007).

8.1.2.5. Método Geral de Síntese dos Derivados Tiazolidínicos (LPSF/GQ)

Em balão de fundo redondo acoplado à condensador adicionou-se quantidades equimolares de uma tiazolidina-2,4-diona 3-substituída (LPSF/GQ) e um éster 2-ciano-3-fenil-acrilato de etila (LPSF/IP), piperidina como catalisador (8-10 gotas) e etanol (10

mL) como solvente. A mistura reacional foi aquecida a 60°C e a progressão da reação foi acompanhada por CCD. Os compostos obtidos foram purificados através de lavagens sucessivas uma mistura água/etanol p.a. (PITTA et al., 2003; SANTOS et al., 2005; MOURÃO et al., 2005).

8.1.3. Avaliação biológica

A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vitro* em esplenócitos provenientes de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c de ambos os sexos, com cerca de 6 a 8 semanas, provenientes do biotério do LIKA.

Nos ensaios para avaliação da atividade anti-inflamatória serão utilizados camundongos machos adultos Albino swiss (*Mus musculus*) com idade de aproximadamente 30 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas antes do experimento em temperatura aclimatada entre 25°C ± 2° C, fotoperíodo de 12/12 horas e água *ad libitum*. Os experimentos foram executados segundo as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética para Experimentos com Animais/UFPE.

8.1.3.1. Obtenção e cultura das células esplênicas

Em cabine de biossegurança, os animais foram sacrificados para retirada do baço. Este foi transferido para placa de Petri para serem triturados. As células foram recuperadas, filtradas em Cell Strainer 70µm e centrifugadas para posterior tratamento de lise das células vermelhas. Após ressuspensão dos esplenócitos em meio RPMI-1640 suplementado, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer. Os esplenócitos foram distribuídos em placas de 24 poços em concentração de 1x10⁶ células/poço. As células foram estimuladas com a lectina Concanavalina-A (Con A) na concentração de 5µg/mL e as doses testadas dos compostos tiazolidínicos foram de 1 µM, 10 µM e 100 µM. Para a avaliação biológica com os antimaláricos as doses testadas dos compostos (cloroquina e hidroxicloroquina) foram de 5 µM, 10 µM , 25 µM, 50 µM e 100 µM. As

placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO₂ e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados em freezer -20°C.

8.1.3.2. Pacientes e voluntários sadios

Pacientes do gênero feminino ou masculino, com idades acima de 18 anos foram atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de artrite reumatoide pelo American College of Rheumatology (ACR) foram selecionados por conveniência segundo demanda do próprio ambulatório. Após esclarecimentos sobre o Projeto de Pesquisa, aqueles que concordaram quanto às propostas foram convidados a participar do estudo, com inclusão dos mesmos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Uma via do TCLE ficou sob posse do paciente e a segunda via com a equipe de pesquisadores.

O grupo controle consistiu de indivíduos da mesma faixa etária, sem diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória e de imunodeficiências, escolhidos aleatoriamente neste hospital. Os voluntários foram do feminino ou masculino, com idades acima de 18 anos.

8.1.3.3. Coleta de sangue

Para este estudo foi necessário coletar amostras do sangue periférico. Foi coletado 15 ml de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina. As coletas foram realizadas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe apresentaram aos voluntários o objetivo do estudo e o interesse da sua participação.

8.1.3.4. Separação do soro

Os soros utilizados para mensuramento de IL-27 em pacientes com LES foram separados por centrifugação (3000 rpm, 10 min).

8.1.3.5. Purificação e cultura das PBMCs

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de doadores saudáveis ou de pacientes com LES ou AR por centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). As PBMCs isoladas foram cultivadas (10^6 células/ml) em meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). As células foram estimuladas com PMA (concentração) e ionomicina (concentração) e as doses testadas dos compostos (cloroquina e hidroxicloroquina) foram de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M. As células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tempos de 24 e 48 horas de incubação e estocados em freezer -20°C.

8.1.3.6. Determinação de citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante de cultura, no soro dos pacientes com LES e dos controles foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. As citocinas avaliadas foram: IFN- γ , IL-1 β , TNF- α e IL-6 (BD Biosciences); IL-23p19 (Ebioscience); IL-27, IL-17 e IL-22 (R&D Systems).

8.1.3.7. Teste de viabilidade celular por MTT

O teste de citotoxicidade foi realizado *in vitro* nas células esplênicas, nas concentrações dos derivados tiazolidínicos correspondente a 100 μ M. A citotoxicidade celular foi quantificada pelo método MTT. Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990).

No primeiro dia, após obtenção das células esplênicas, estas foram inseridas em placas de 96 poços na proporção de 2×10^6 células/poço. As células foram incubadas por 2 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Em seguida, foram adicionados os derivados propostos neste trabalho. Após um período de 48 horas de incubação foi adicionada a solução de MTT (0.5 mg/ml). Após a formação dos cristais de formazam, aproximadamente 3 horas, foi adicionada a solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) para solubilização dos mesmos. As absorbâncias foram lidas em leitor ELISA a 570 nm.

8.1.3.8. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* pelo método air-pouch

Caracterizado pela injeção subcutânea de carragenina, o air-pouch tem sido utilizado para estimar os efeitos anti-inflamatórios de drogas como um excelente modelo de inflamação aguda. A resposta inflamatória deste método pode ser presumida pela migração de leucócitos polimorfonucleares e pela participação de vários mediadores químicos inflamatórios, como os leucotrienos e prostaglandinas (MORIKAWA et al., 2003; KOO et al., 2006).

O estímulo inflamatório deste modelo experimental é induzido pela carragenina, agente utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório de AINES, assim como, a investigação de novos compostos sintetizados (SULEYMAN e BUYUKOKUROGLU, 2001; CUZZOCREA et al., 2004). Diversos trabalhos são realizados com esse tipo de protocolo experimental, onde se destaca a atuação da carragenina como indutora inflamatória e a participação dos mediadores envolvidos na resposta inflamatória.

Romano e colaboradores (1997) realizaram um trabalho com o objetivo de investigar o papel das citocinas, em particular o TNF- α , durante a fase primária da inflamação aguda. No mesmo estudo também foi analisada a relação entre esses mediadores e o tempo de curso da migração de células juntamente com a produção de prostaglandinas. Os resultados indicaram a presença de TNF- α como também à migração de leucócitos paralela a produção de prostaglandinas.

Estudo realizado por Palaska e colaboradores (2002), onde a atividade antiinflamatória de compostos 1-aciltiosemicarbazidas, 1,3,4-oxadiazóis, 1,3,4-tiadiazóis

e 1,2,4-tiazol-3-tionas foram avaliadas, demonstrando que o air-pouch induziu os estímulos inflamatórios de maneira elevada por meio da carragenina.

Passos e colaboradores (2007), também ressaltam o modelo inflamatório do air-pouch induzido por carragenina, com eficácia na migração de neutrófilos e sugerem ser uma valiosa ferramenta na avaliação de novas drogas anti-artrite.

Dessa forma, o modelo do air-pouch (bolsão de ar) induzido por carragenina foi definido como protocolo experimental para a avaliação *in vivo* anti-inflamatória dos derivados tiazolidínicos da série LPSF/GQ.

No primeiro dia, injetou-se 2,5 mL de ar estéril da câmara de fluxo laminar no dorso do animal, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio foram administrados os compostos em estudo por via oral. Após uma hora da administração foi injetado 1 ml de solução de carragenina a 1 % (p/v) dentro do air-pouch. Decorridas 6 horas após a aplicação da carragenina, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, as bolsas foram lavadas com 3 ml de solução tampão de PBS contendo (0,1 %) EDTA como líquido de arraste. O exudato foi previamente diluído em solução de Turk, e então realizada a contagem dos leucócitos polimorfonucleares em câmara de Neubauer (ROMANO et al., 1997). Os animais, divididos em grupos de 8, receberam doses de 3 mg/kg das substâncias testadas e o grupo controle negativo recebeu o veículo. As doses testadas consistiram em 3 mg/kg.

Os cálculos para atividade anti-inflamatória *in vivo* das substâncias testadas foram realizados de acordo com a fórmula: Inibição Inflamatória (%) = [(n - n')/n] x 100. Onde n e n' indicam a média de n = 8 animais da quantidade de células contadas nos grupos controle e teste, respectivamente (PALASKA et al., 2003).

8.1.4. Referências das Metodologias

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFI, P.; PATEL, N. S.A.; PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P. K.; ROSA, M.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** V.483, p. 79– 93, 2004.

COPE, A.C.; HOFMANN, C.M.; WYCKOFF, C.; HARDENBERGH, E. Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic esters. **J. Am. Chem. Soc.**, V. 63, p. 3452-3456, 1941.

COUTO, J.A. **Novos Compostos 5-(4-metil-sulfonil-benzilideno)-imidazolidínicos e tiazolidínicos: Síntese, Elucidação Estrutural e Atividade Antiinflamatória**. 2006. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

DAVIS, J.; DAINS, F.B. **Am. Chem. Soc.**, 16, 341-145, 1935. *In*: LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Rev. Univ. Rural. Ser. Ciênc. Exatas e da Terra**, V. 18/20, n.1/2, p.1-8 1998.

KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. **J. Ethnopharmacol.** V. 103, p. 496–500, 2006. LIBERMAN, D.; HIMBERT, J.; HENGL.; L. Bull. Soc. Chim. Fr. p.1120-1124, 1948. *In*: LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Rev. Univ. Rural. Ser. Ciênc. Exatas e da Terra**, V. 18/20, n.1/2, p.1-8 1998.

MORIKAWA, K.; NONAKAA, M.; NARAHARAA, M.; TORIIB, I.; KAWAGUCHIC, K.; YOSHIKAWAC, T.; KUMAZAWAD, Y.; MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**. V. 74, p. 709–721, 2003.

MOURÃO, R.H.; SILVA, T.G.; SOARES, A.L.M.; VIEIRA, E.S.; SANTOS, J.N.; LIMA, M.C.A.; LIMA, V.L.M.; GALDINO, S.L.; BARBE, J.; PITTA, I.R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones **Eur. J. Med. Chem.** V. 40, p. 1129–1133, 2005.

OGATA e TSUSHIDA, J. **Amer. Chem. Soc.**, 1959. *In*: ZABICKY, J. **J. Chem. Soc.** The Kinetics and Mechanism of Carbonyl-Methylene Condensation Reactions. p. 683-687, 1961.

PALASKA, E.; SAHIN, G.; KELICEN, P.; DURLU, N. T.; ALTINOK, G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. **II Fármaco**. V. 57, p. 101–107, 2002.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M. DA; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea* **J. Ethnopharmacol.** V. 110, p. 323–333, 2007.

PEREIRA, D.T.M. **Síntese, Comprova  o Estrutural e Atividade Antiinflamatória de Compostos Tiazolidin  nicos-3,5-Dissubstituídos**. 2007. (Doutorado em Ciências Biológicas) Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.

PITTA, I.R.; LIMA, M.C.A; GALDINO, S; BARBE, J. Compostos arilidenotiazolidinadi  nicos com atividade hipoglicêmica Br, PI 0144/02 em 10/04/2003.

ROMANO, M.; FAGGIONI, C.A. R.; SIRONI, M.; SACCO, S.; ECHTENACHER, B.; DI SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. Carrageenan-induced Acute Inflammation in the Mouse Air-pouch Synovial Model. Role of Tumour Necrosis Factor. **Mediat. Inflamm.** V. 6, p. 32-38, 1997.

SANTOS, L. C.; UCH  A, F. T.; MOURA, R. O.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; BAERBE, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of new thiazolidine-2,4-diones, 4-thioxothiazolidinones and 2-thioxoimidazolidinones. **Heterocycl. Commun.** V.11, n.2, p.121-128, 2005.

SKEHAN , P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990

SÜLEYMAN, H.; MEHMET EMIN ; GLU, B. The Effects of Newly Synthesized Pyrazole Derivatives on Formaldehyde-, Carrageenan-, and Dextran-Induced Acute Paw Edema in Rats **Biol. Pharm. Bull.** V. 24, n.10, p.1133—1136, 2001.

UCHÔA, F.D.T. **Síntese e avaliação da atividade antiinflamatória de 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas.** 2004. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

8.2. Normas das revistas

8.2.1. Normas Acta Pharmaceutica

ACTA PHARMACEUTICA (AP) publishes original research papers, short communications, preliminary communications (notes) and review articles in the pharmaceutical and related sciences. The journal also carries book reviews and obituaries. The last issue within each volume (No. 4) also gives the subject index, author index, acknowledgements to referees and the tables of contents throughout the volume as well as instructions to authors.

Full papers of current issues may be found on the websites:

<http://public.carnet.hr/acphee/>

http://hrcak.srce.hr/index.php?show=casopis&id_casopis=23

<http://www.versita.com/science/medicine/apharma/>

AIMS AND SCOPE

AP is an international, multidisciplinary journal devoted to pharmaceutical and allied sciences and contains articles predominantly on core biomedical and health subjects. The aim of AP is to increase the impact of pharmaceutical research both in academia, industry and laboratories. With strong emphasis on quality and originality, AP publishes reports from the discovery of a drug up to clinical practice. Topics covered are: analytics, biochemistry, biopharmaceutics, biotechnology, cell biology, cell cultures, clinical pharmacy, drug design, drug delivery, drug disposition, drug stability, gene technology, medicine (including diagnostics and therapy), medicinal chemistry, metabolism, molecular modelling, animal and clinical pharmacology, peptide and protein chemistry, pharmacognosy, pharmacoepidemiology, pharmacoeconomics, pharmacodynamics and pharmacokinetics, protein design, radiopharmaceuticals, toxicology.

EDITORIAL POLICY

Original research papers should contain unpublished results of original research, which

must be presented in sufficient detail to ensure the reproducibility of the described experiments.

Preliminary communications are brief scientific contributions whose character requires rapid publication without supplying the details necessary to reproduce the described experiments.

Short communications (notes) provide reports on short, but completed, research or descriptions of original laboratory techniques (methods, apparatus).

Review articles are concise and critical surveys of novel accomplishments in the author's research field. They may also contain original theoretical considerations. The results and role of the author's research must be clearly distinguished from the results of the investigators referenced. As far as review articles are concerned *Acta Pharmaceutica* prefers critical reviews written by the authors already distinguished in the respective field. Otherwise, the review article should cover the topic of the utmost scientific interest. Only papers providing previously unpublished scientific information will be entered in the first three of the above categories. Authors should specify to which of the four categories the submitted material should be allocated. Authors of review articles are advised to consult the Editorial Board prior to submitting the article.

The manuscripts should be submitted in grammatically and stylistically correct English and written in the concisest form possible, which still ensures clarity of presentation. The form and illustrations of the manuscripts should comply with the papers recently published in the AP.

The authors are encouraged to suggest three referees, but the Editorial Board reserves the right to choose other referees, who will remain anonymous.

Manuscripts submitted to AP are only accepted on the understanding that they are subject to editorial review and review of at least two independent referees, that they have not been and will not be published whole or in a part in any other journal, and that recommendations to comply with ethical standards when performing clinical and other biological experiments have been adhered to.

In case of contradicting reviews of 2 referees, the manuscript is sent to a third one and/or subjected to editorial evaluation. Each article accepted for publication is language edited. During the submittance phase or during revision of the manuscript authors should sign

and return to the Editor-in-Chief the *Authors' agreement form* (by e-mail, fax or regular mail).

Publishing frequency is four times a year (volume).

CONTENT AND STRUCTURE OF THE MANUSCRIPTS

According to the methods of modern information science, the titles of submitted papers should be short and informative; double titles should be avoided.

The title should be followed by the full names of all authors, and these by the title(s) of the institution(s). An abstract (short summary) of less than 150 words and key words should be supplied. The abstract should be written in the third person. Its main purpose is to aid the abstracting journals to copy it literally. The abstract should contain solely the essential results and conclusions of the presented work. Textual formulations from the title should not be repeated and the findings rather than the aim of the work should be described.

Manuscripts should be divided into chapters. The aim of the work should be explained in the introductory part. The work that directly preceded the submitted information should be described in the shortest form possible. Introduction should be written in the form of a report and extensive literature reviews will not be accepted. Since the articles are intended for experts in their respective fields, no general information should be given.

Experimental data should be presented logically in a straightforward and clear fashion. Results should be distinctly separated from comments and discussion. Well known methods and techniques should not be described in detail. They should be designated only by the names of their authors or by literature references. Standard statistical methods should be applied, where necessary, to present the results. SI units should be used throughout.

MANUSCRIPT DESIGN

Text. The manuscript should be printed single sided and double spaced with 4 cm left margin in its entire length. It should be submitted in triplicate. Footnotes should be avoided.

References. The references cited should be selective rather than extensive. An exception to this rule are the review articles. The references should be listed on a separate sheet numbered by Arabic numerals according to the sequence in which they appear (in parentheses) in the text. If a reference is cited twice or more times, the same number should be used throughout. References such as »personal communication«, »unpublished results« and »in press« without the stated name of the journal are not allowed. References from journals should include the initials of the first (and middle) name, last name of all authors, the international abbreviation of the journal (according to the *Chemical Abstracts*), volume, year of publication (in parentheses), and full pages. References from books should contain the initials of the first (and middle) name, last name of the author(s), the title of the book, the publisher city, year of publishing and full pages. The punctuation in the references should comply with the examples given below.

Example for journal reference:

S. K. Mishra and K. Pathak, Formulation and evaluation of oil entrapped gastroretentive floating gel beads of loratadine, *Acta Pharm.* **58** (2008) 187—197; DOI 10.2478/v10007-008-0001-8.

Example for book reference:

E. Mutschler and H. Derendorf, *Drug Actions, Basic Principles and Therapeutic Aspects*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 1995, pp. 16–26., or J. Feely, T. Pringle and D. MacLean, *Calcium Channel Blockers*, in *New Drugs* (Ed. J. Feely), 3rd ed., BMJ Publishing Group, London 1994, pp. 82–93.

Example for patent reference:

H. P. Wang, O. Lee and C. T. Fan, *Preparation of Gemfibrozil Analogs as Anticholenergetic Compounds*, U.S. Pat. 5,530,145, 25 Jun 1996; ref. *Chem. Abstr.* **125** (1996) 142277u.

Appendices. The number of illustrations (photographs, diagrams, schemes, structural formulas) should be kept to a minimum and contribute to the clarity and understanding of the text. The drawings should be technically perfect on a format not larger than A-4. Spaces

for illustrations are to be marked in the text while the pertaining legends should be added on a separate sheet. The illustrations should be appended separately and marked with the corresponding numerals, name of the author, and title of the article on the back side. Photocopies of illustrations should be added to the duplicates of the text. Colour photographs will not be reproduced. All illustrations, except for formulas, should be referred to as figures (*e.g.* Fig. 1).

The tables should be clear, descriptive, on separate sheets, and added to all three copies of the manuscript. Tables should be numbered using Roman numerals. They should be provided with overhead titles.

Tables and diagrams should be designed in a fashion that enables understanding without referring to the text. Presentation of the same results in figures and tables will not be accepted.

SUBMITTING OF MANUSCRIPTS

Manuscripts may be submitted as attachments to e-mail messages, or as hard copies accompanied by an electronic version on CD.

If the manuscript is accepted for publication after the reviewing process, the authors are requested to submit the final version both as a hard copy and electronically. The preferred text-processor is WinWord. Included should be also the files containing computer generated graphics, artwork, bitmaps, and/or scanned images in one of the following formats: CDR, EPS, TIF, PCX and JPG. For large image files, use one of the file compressing programs (ZIP, ARJ, RAR). The CD should be clearly labelled, stating the version of the program used, and its contents should exactly match the accompanying paper output.

GENERAL REMARKS

Manuscripts that do not comply with the above guidelines will be returned to the author

for required changes. Only after compliance is established, will they be processed for reviewing. Non-adherence to the guidelines slows down the publishing process. Manuscripts returned to the authors for changes and not re-submitted within a period of one month will be considered as new articles as per the date of the last receipt. The editorial staff reserves the right to make editorial corrections of the manuscript and adjust it to the requirements of the journal.

The manuscripts should be sent to: Croatian Pharmaceutical Society, Masarykova 2, HR-10000 Zagreb, Croatia, or to the Editor-in-Chief (Prof. Dr. S. Luterotti, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovacica 1, HR-10000 Zagreb, Croatia).

The authors will receive one copy of the respective issue of ACTA PHARMACEUTICA free of charge. However, offprints are available provided the order is received together with the corrected proofs and a copy of the bank draft is enclosed. If the authors do not return the order form, it is assumed that they do not need offprints of their article. First 30 reprints are charged US\$ 50. Further 30 reprints will be charged additional US\$ 30. Costs are substantially higher for offprints order after an issue has gone to press. Prices are subject to change without notice. Payments should be made to the order of the Croatian Pharmaceutical Society, Masarykova 2, HR-10000 Zagreb, Croatia, through ZAGREBACKA BANKA ZAGREB, Savska 60, Zagreb, Croatia, Account No. 70300-840-3206386 SWIFT ZABA HR 2X (for US\$ payments). The title and the manuscript number must be stated on the offprint order. The order should be sent by fax (fax No. + 385 1 48 56 201) together with a copy of the bank draft within 72 h of receipt and the original should be mailed by post together with the corrected proofs.

8.2.2. Normas Rheumatology

Manuscript Preparation – Rheumatology - All manuscripts must be submitted online through Manuscript Central and include:

- a disclosure statement from all authors declaring any potential conflicts of interest or stating that the authors have no conflicts of interest;
- a funding statement acknowledging any funding support received.

All papers under consideration by *Rheumatology* may not be offered or be under consideration for publication elsewhere. Articles must not have been published elsewhere (in part or in full). If the work or an abstract of it has been previously published, for instance, in another language, then this fact should be made clear in the covering letter. Authors must declare, and submit copies of, any manuscripts in preparation or submitted elsewhere that are closely related to the manuscript to be considered. See publishing misconduct for more details. All authors must be aware of Journal policies and agree to the submission of the manuscript to *Rheumatology*. The Journal allows authors to deposit their papers on preprint servers and their data in public databases.

MANUSCRIPT FORMAT

Style - Please refer to a recent issue of *Rheumatology* for guidance on style and layout of articles. Also refer to the Article type section for guidance on relevant information for each article type. All papers must be written in English on A4 paper, single column using double spacing. Prepare your manuscript, including tables, using a word processing program and save it as a .doc or .rtf file. All files in these formats will be converted to PDF format on submission.

Title page - The title page should contain:

- title of the article,
- authors' names and affiliations,
- name, postal address and e-mail address of the corresponding author,

- a short title that is no more than 45 characters for each page (a running header, which does not apply to letters).

The title is a concise description of the article, covering the main aspects of the work.

For all original articles, please mention the type of study design when relevant.

For example, ‘Systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestation incurs high disease costs: a cost-of-illness study in Hong Kong’

We advise authors to avoid the use of abbreviations that are not part of the standard list.

Author names and affiliations - Every author listed in the manuscript should qualify for authorship. Anyone who has contributed to the manuscript but does not qualify for authorship should be listed in the acknowledgement section with their permission.

Author names should reflect the author’s institution where the work was carried out and include department, institute, town and country information. Affiliations should be indicated by superscript numbers next to each authors’ name in numerical order starting from 1. For example, Wolfgang A. Schmidt¹, Andreas Krause¹, Bernd Schicke², Jörn Kuchenbecker³ and Erika Gromnica-Ihle¹.

Every article must have a corresponding author providing a complete postal and e-mail address for them. Only one author for correspondence can be listed for a paper. If required, the corresponding author will be expected to answer queries regarding the paper. Authors whose present address is different from their affiliation address should provide their present address as a separate address (not as part of their affiliation information).

For authors who have contributed equally to a paper, please place an asterisk (*) next to their names and include an explanatory note, e.g. *K Smith and J Blogs equally contributed to this study.

If an author is deceased include them in the authorship list and include an explanatory footnote.

For trials involving large numbers of investigators, refer to the authorship section for information on how to format the authorship list.

Abstract - A structured abstract is no more than 250 words organised into the headings: Objectives, Methods, Results and Conclusions.

Format Guide:

- Do not include citations.
- Avoid beginning the abstract by repeating the title.
- Ensure that data in the abstract is exactly the same as that in the main body of the text.
- Mention if there are any adverse events.

For clinical trials a trial registration heading should also be included (see the clinical trial section for more information). If your study has received funding please include the heading 'Funding:' after conclusion and indicate the main funding source of the study/project, e.g. Funding: ARC.

Do keep in mind some readers will only have access to abstracts from which they might have to base their decisions. Refer to the CONSORT checklist for abstracts of clinical trials.

Reviews have an unstructured abstract; Letters do not have an abstract.

Key words - Provide up to 10 key words that reflect the content of the article to aid Internet searches.

Introduction - The introduction should be concise and clear, and give relevant details and background, providing a context to the study. The objective of the study should be clearly stated and the nature of the main question(s) to be answered.

Methods - This section should contain details relevant to the procedures of the study, with sufficient information regarding methods and materials so that the experiments can be easily replicated. All manuscripts in which experiments on patients or healthy volunteers, patients' case histories or use genetic material are reported should contain an appropriate statement confirming that ethical approval (providing the name of the authorizing body) and informed consent (according to the Declaration of Helsinki) was obtained. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the

institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed. For more information refer to the Journal ethical guidelines and mandatory requirements. If you provide any equipment or specific reagent used, provide the name of the manufacturer, city and country.

Clinical trials - When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format:

Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number]. To ensure the highest quality of research reporting, *Rheumatology* follows the EQUATOR network resource centre (<http://www.equator-network.org/>) for good research reporting.

Rheumatology requires the submission of the CONSORT checklist with the submission of randomised controlled trials.

Results - These should be concise. A general guideline is that there should be sufficient information to justify the conclusions. Data in tables or figures should not be repeated in the text. The International System of Units (SI) should only be used. For more information, refer to the measurements section.

Discussion - This section should provide details of the significance of the findings without repetition of the introduction and results. It is a critical examination of the study and should end with a clear and brief conclusion. Any limitations of the study should be discussed within this section.

Key messages - A key message is a concise sentence that highlights the main conclusion(s) of the paper, indicating its importance and/or interest. It must be a complete sentence by itself and not part of a supporting sentence. Include up to 3 key messages. Each key message should be a maximum of 15 words.

Note: For Case Reports and Letters to the Editor (other) only one Key Message (not more than 15 words) should be provided. Editorials and clinical vignettes do not have key messages.

Acknowledgements - Contributors who do not meet the criteria for authorship should be included in this section. People acknowledged in this section must be informed and agreed to their inclusion in the paper. If authors have received any writing assistance this must be disclosed in this section, naming the funding source(s) for such assistance.

Conflict of interest statement - All papers submitted to the Journal must contain a disclosure statement indicating any potential financial conflicts of interest that any of the authors may have (according to the Journal's conflict of interest policy).

If none of the authors have any conflicts, insert a statement that the authors declare no conflicts of interest. For additional information on the different types conflict of interest, see the World Association of Medical Editors' (WAME) policy statement on conflicts of interest.

Funding statement - Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear after the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'National Institutes of Health', not 'NIH' (full RIN-approved list of UK funding agencies) Grant numbers should be given in brackets as follows: '[grant number xxxx]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers xxxx, yyyy]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency).

- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

Any role a sponsor played should be detailed in the acknowledgement section. For example, if they were involved with the writing, study design, collection, analysis or interpretation of data. For more information on funding [click here](#).

For example, '*Funding statement*: This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789].'

If funding has been provided for your study a 'Funding:' heading should be added to the end of the abstract listing the companies/institutes who have funded the work, e.g. Funding: ARC.

References - References in the text should be given as numbers within square brackets, placed in line with the text and in order of appearance (Vancouver style). They should be listed in numerical order at the end of the paper.

All authors should be included in a reference when there are six or less but only the first three followed by et al. when there are seven or more.

Authors' names should be followed by the title of article, abbreviated name of the Journal (as per PubMed abbreviations), year, volume and first and last page numbers.

References to books should state the author, followed by chapter title, Editors' names, book title, place of publication, publisher, year, and appropriate page numbers.

Example of a journal article:

1. Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou N A. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2002; 41:1232-9.

When an article has been published online but is not yet assigned to an issue the digital object identifier (DOI) number should be used as in the following example:

2. Bastin S, Bird H, Gamble G, Cundy T. Paget's disease of bone—becoming a rarity? Rheumatology 2009 published on 16 July 2009. doi:10.1093/rheumatology/kep212

Example of a book:

3. Mitchell SC, Waring RH. S-Oxygenase III human harmacogenetics. In: Damani LA, ed. Sulphur-containing drugs and related organic compounds, Vol. 2B. New York: Ellis Horwood, 1989:101-19.

Unpublished communications/personal communications should be cited in the main text in parentheses (after obtaining appropriate permission) along with the name of the person, institution.

The accuracy and completeness of the references is the responsibility of the authors.

Figures and Tables - Figures and tables should be included at the end of the main document or uploaded as separate files.

All figures and tables must be referenced in the text and numbered consecutively in the order they appear in the text. Avoid repeating data presented in the table in the text, but only infer from the data in the table.

Each figure/table must have a legend beginning with a brief title (no more than 10-15 words) that reflects its content. Titles should be included as part of the legend, not as part of the figure/table. Legends should be a concise description of the data in the figure/table avoiding any repetition of information already present in the manuscript and should not be more than 100 words each. All symbols, error bars and abbreviations used in the figure/table should be defined. Common abbreviations or those that have been defined in the text need not be defined in the figure/table legend.

Data should only be presented in one form, either a table or figure.

- Figures
- Tables

Figures - Prepare your figures at print quality resolution .tif files:

- 1200 dpi [dots per inch] for line drawings
- 300 dpi for colour and half-tone artwork.

For useful information on preparing your figures for publication, go to <http://cpc.cadmus.com/da>.

For online submission, please also prepare a second version of your figures at low-resolution (72 dpi) for use in the review process only; these figures can be saved as .jpg, .gif, .tif or .eps format.

Please also see the Journal's policy on image manipulation for detailed information.

Any lettering should be in proportion with the overall dimensions of the drawing and should be of approximately equal size. It should be in lower-case type with the first letter capitalised.

Parts of a figure should be labelled with upper case A, B, C, etc.

Figures should not contain more than one section unless the parts are logically connected.

Scale bars should be used instead of magnification factors.

Graphs: 3D graphs should not be used unless necessary. If using hatching, please keep it simple

Forest plots: We prefer the tabular information as a word document table and the plot as a separate file as a figure.

Colour figures: Colour illustrations are accepted, but authors will be required to pay the cost of reproduction (£100/\$190/€150 per figure). Alternatively, if the colour is not crucial for the image's scientific understanding, colour can be published online only, with a black and white version in the print Journal.

Line drawings: No additional artwork, redrawing or typesetting will be done. Faint or fine-grained stippling or shading or continuous-tone shading will be lost or may appear black on reproduction. Please use a coarse stippling or hatching.

Any previously published material should have relevant written permission of the author and copyright holder for its reproduction for both print and electronic perpetuity. Please include a statement in the figure legend acknowledging the original source. Refer to the Permissions section for detailed information.

Tables - Each table should be typed on a separate sheet with an appropriate legend and footnotes explaining any abbreviations (footnotes should be indicated with an alphabetical letter a, b, c, etc.).

Tables must be numbered in consecutive order in order of appearance in the text and must be in an editable format, preferably in Microsoft Word®.

Each table should have a brief, descriptive title that is self-explanatory. Data provided in the table must be fully defined including units and a description of how the data is represented (e.g. mean (S.D.); n, %). All P values must be defined. Please click [here](#) for an example of a table. If a cell is blank, please indicate as NR (not reported) or NS (not stated). Bold text can be used to highlight particular information along if an explanation is given in the footnote. Shading in tables is not allowed.

TECHNICAL DETAILS

- Measurements
- Materials
- Statistics
- Terminology
- Abbreviations

Measurements - Measurements of length, height, weight and volume should be reported in metric units (metre [m], kilogram [kg], litre [l]) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in mmHg. All other measurements including laboratory measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

For a list of abbreviations of SI units, please refer to Baron DN (ed.): Units Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, 4th edn. London: Royal Society of Medicine.

Materials - When quoting specific materials or proprietary drugs, authors must state in parentheses the name, town/city and state/country of the manufacturer.

Drug names should only be referred to by their generic non-proprietary names.

Statistics - Statistical methods must be detailed and should conform to the statistical guidelines published in Rheumatology 2009; 48: 462-3.

Statistical checklist:

- Name and version of the statistical software

- Test of tests used in the methodology
- Provide exact P values with CIs
- Do not use statistical significance when you mean clinical significance

Terminology - Juvenile idiopathic arthritis should be used instead of juvenile chronic arthritis.

Reactive arthritis should be used instead of Reiter's syndrome.

We prefer authors to use the terminology child, young person or adolescent instead of paediatric patient as this term may be ambiguous.

Abbreviations - A standard list of abbreviations was approved by the editors of the journals in the rheumatology field. Please find below a link to a PDF file of the abbreviations.

Abbreviations should be unambiguous; if they do not appear in the standard list, their meaning should be clearly explained when they are first introduced.

SUPPLEMENTARY DATA

Definition: Material that cannot be included in the print version for reasons of space or practicality, but would nevertheless benefit the reader. It should not be essential to understand the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content.

Such information might include more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures.

All text and figures must be provided in suitable electronic formats (instructions for the preparation of Supplementary Data are available below). All material to be considered as Supplementary Data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication. A reference to the supplementary material must be placed within the main text for example:

See supplementary figure (see supplementary data available at *Rheumatology* online).

Supplementary Data should be submitted in a separate file, in its final form. The file should be clearly marked as Supplementary Data, with the file names, author's surname and manuscript title.

Please note that Supplementary Data is not copyedited or typeset, so please ensure that it is clearly and succinctly presented, and that the style conforms to the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any Internet browser.

- Examples
- Acceptable formats
- Recommendations

Examples- More detailed methods, extended data sets/data analysis, tables, or additional figures.

Acceptable formats - A maximum of 10 files is acceptable as Supplementary Data for one article. The maximum size per file should not exceed 1.5 MBytes, and files must be as small as possible, so that they can be downloaded quickly. An HTML index page is created to link in the Supplementary data file(s). Please provide short (2-4 word) titles for each individual file; these will be used to create links to the files from the index page.

Recommendations

- Pick a common cross-platform (PC, Mac, Linux/UNIX, Amiga etc.) format for your supplementary data to allow the greatest access.
- Provide text files in PDF (.pdf), MS Word (.doc), HTML files (.html) or RTF (.rtf) format. Files supplied in Word or RTF may be used to create a PDF file.
- Provide spreadsheet files in MS Excel (.xls) or CSV format.
- Provide image files in tif, gif or jpg format. Images should be a maximum size of 640 x 480 pixels (9 x 6.8 inches at 72 pixels per inch).
- Provide audio files in mp3 format.
- Provide movie clips in mpeg format.

PERMISSIONS

If any figures/tables in your paper have already been published we will require a copy of the permission of the author and the copyright holder. Permission must be obtained for reproduction in both print and electronic media in perpetuity. An appropriate statement will also need to be added to the legend and a copy of the original published material must be provided to the Editorial Office. It is the author's responsibility to obtain permission.

Figures/tables adapted from previously published sources and deemed to be sufficiently different from the original source do not require permission but a reference must be included acknowledging the original source e.g. Adapted from Smith et al [13]. A copy of the original published figures/tables will need to be provided.

LANGUAGE EDITING

Before submitting your manuscript you may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is understood by journal Editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication.

If you would like information about one such service please [click here](#). There are other specialist language editing companies that offer similar services and you can also use any of these. Authors are responsible for all costs associated with these services.

Some tips on language are given below:

- Use active voice rather than passive voice.
- For randomised controlled trials, mention if the patients were randomly assigned to a drug or were randomly selected, rather than patients were randomized to a drug.
- Avoid starting sentences with 'this' unless it is clear what the 'this' refers to in the previous sentence or is used as a pronoun.
- Always write in simple and clear English that can be understood by an international audience.
- Avoid single sentences as paragraphs and long complex sentences.

8.2.3. Normas Lupus: An International Journal

Manuscript Preparation

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3cm for left and right hand margins and 5cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point. SI units should be used throughout the text.

Keywords and Abstracts

The title, keywords and abstract are key to ensuring that readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting SAGE's Journal Author Gateway Guidelines on How to Help Readers Find Your Article Online.

Corresponding Author Contact details

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Academic affiliations are required for all co-authors.

Guidelines for submitting artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's Manuscript Submission Guidelines.

TABLES

Each table should be numbered consecutively with an Arabic numeral. Each should have a separate caption or title. Methods not described in the text and abbreviations should be explained at the foot of the table. Footnotes should be designated by superior lower case letters (a, b, c etc). Vertical lines should not be inserted in the table. Tables must be referred to specifically in the text of the paper.

FIGURES

Lettering should be planned for 50% reduction; text should be readable after reduction. Figures should be referred to as Figure 1, Figure 2 etc. Figures must be referred to specifically in the text of the paper.

Images should be supplied as bitmap based files (i.e. with .tiff or .jpeg extension) with a resolution of at least **300 dpi** (dots per inch). Line art should be supplied as vector-based, separate .eps files (not as .tiff files, and not only inserted in the Word or pdf file), with a resolution of **600 dpi**. Images should be clear, in focus, free of pixilation and not too light or dark.

Colour photographs and Figures - Important information:

Colour photographs and Figures, when accepted, will be published online. In the printed version, they will be in black and white (unless colour prints are paid for). Authors who submit in colour must ensure that their figures are of the highest definition for the black and white version otherwise these may not be accepted. In particular immuno-fluorescent and histological figures, as well as skin rashes, must be paid for in colour or omitted from the manuscript and replaced in a descriptive format. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, these figures will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the possible costs from SAGE after receipt of your accepted article.

Guidelines for submitting supplemental files

The journal may be able to host approved supplemental materials online, alongside the full-text of articles. Supplemental files will be subjected to peer-review alongside the article. Please contact the Editor (editorial@lupusjournal.co.uk) in the first instance.Â For more information please refer to SAGEâ€™s Guidelines for Authors on Supplemental Files.

English Language Editing

Non-English speaking authors who would like to refine their use of language in their manuscripts should have their manuscript reviewed by colleagues with experience of preparing manuscripts in English. Alternatively it might be useful to consider using a professional editing service. Visit <http://www.uk.sagepub.com/journalgateway/msg.htm> for further information.

8.3. Submissão Artigo 3

24-Jan-2012

Dear Prof. Pitta:

Your manuscript entitled "**Decreased serum interleukin 27 in Brazilian systemic lupus erythematosus patients**" has been successfully submitted online and is being considered for processing.

Your manuscript ID is LUP-12-037.

Please quote the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/lupus> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/lupus> .

Thank you very much for submitting your manuscript to Lupus.

Kind regards.

Yours sincerely

Denzil Fletcher
Lupus Editorial Office