

# UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

# PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE INÉDITAS *N*-ACIL-HIDRAZONAS

LAÍS PERES SILVA

Salvador

2022

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE INÉDITAS N-ACIL-HIDRAZONAS

# LAÍS PERES SILVA

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Santana Meira

Linha de Pesquisa: Linha I – Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura - UNEB – Campus I Bibliotecária: Célia Maria da Costa – CRB5/918**

S586a	Silva, Laís Peres Avaliação do potencial imunomodulador de inéditas n-acil- hidrazonas /Laís Peres Silva. – Salvador, 2022. 89 f. : il.
	Orientador: Cássio Santana Meira. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, Campus I. 2022.
	Contém referências.
	1. Anti-inflamatórios. 2. Pesquisa imunológica. 3. Hidrazonas. 4. Química farmacêutica. I. Meira, Cássio Santana. II. Silva, Daniel Silva da. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título. CDD:615.19



# FOLHA DE APROVAÇÃO

## " AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE INÉDITAS N-ACIL-HIDRAZONAS "

# LAIS PERES SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 05 de outubro de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Professor(a) Dr.(a) CASSIO SANTANA MEIRA

Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Professor(a) Dr.(a) ANDRE LACERDA BRAGA TELES Universidade do Estado da Bahia - UNEB Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Estadual de Feira de Santana

Professor(a) Dr.(a) THEOLIS COSTA BARBOSA BESSA Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ Doutorado em Patologia Humana Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho ao meu pai que é a minha fonte de inspiração, tudo é por ele, sempre.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por todo cuidado, proteção e misericórdia durante toda essa jornada.

Agradeço aos meus familiares que ao longo deste tempo foram essenciais para mim, por todo amor e apoio, destaco aqui a importância daqueles que estiveram sempre ao meu lado, minha mãe Simone Peres e meu pai Edilson Silva, assim como a minha segunda mãe Maria de Lourdes Peres e meu segundo pai Anailton Dias, as minhas tias Lúcia Morais, Cristina Peres, Aline Peres e minha comadre Isabela Peres.

Às amigas Camila Quésia, Laisa Borges e Mirelle Albuquerque agradeço pelo companheirismo e pelo cuidado em sempre me ouvir.

Ao meu incrível orientador Dr. Cássio Santana Meira agradeço pela verdadeira orientação, por sempre mostrar o caminho e pela oportunidade ímpar de crescimento e evolução no meio acadêmico.

Agradeço a Ivanilson Pimenta, Gabriela Grimaldi, Luiza Opretzka, Luciano Vasconcellos e Dahara Carvalho por todo auxílio e ensinamentos que a mim foram passados. Também expresso aqui meus agradecimentos aos meus amigos do grupo P e G (Dan, Lu, Ale e Phydel) mesmo de longe em diversos momentos me senti acolhida, dividir essa jornada até aqui com vocês foi incrível.

Agradeço também a Dra. Milena Botelho Pereira Soares pelo suporte e ao Dr. José Maurício dos Santos pela importante colaboração científica ao longo do projeto.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA) e ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) por me permitirem realizar a pesquisa e pela rica oportunidade.

#### RESUMO

SILVA, P. L. **Avaliação do potencial imunomodulador de inéditas** *N***-acilhidrazonas** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2022; 89p.

Introdução: As N-acil-hidrazonas são moléculas promissoras para a prospecção de fármacos devido à sua variedade de atividades biológicas, das quais destaca-se a atividade imunomoduladora. Considerando-se que o uso contínuo de medicamentos imunomoduladores disponíveis atualmente relaciona-se com diversos efeitos adversos e com o agravo de desordens inflamatórias, faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes imunomoduladores. Objetivos: O presente trabalho objetiva avaliar o efeito imunomodulador de inéditas N-acil-hidrazonas in vitro e em modelos experimentais de inflamação. Materiais e Métodos: Inicialmente, a citotoxicidade dos compostos foi determinada em culturas de macrófagos através do método Alamar blue. Em seguida, foi avaliado o efeito antiinflamatório das moléculas em macrófagos ativados com LPS + IFN-y pela dosagem de óxido nítrico e citocinas pela reação de Griess e ELISA, respectivamente. Em adição, foi verificada a capacidade hemolítica das moléculas utilizando eritrócitos humanos. Para determinar o efeito imunossupressor das moléculas, a produção das citocinas IL-2, IL-4 e IFN-y foi avaliada em cultura de esplenócitos ativados com concanavalina A. Por fim, a molécula mais ativa, Fc54, foi avaliada em modelo murino de choque endotóxico induzido por LPS e peritonite aguda induzida por carragenina. Resultados е discussão: As N-acil-hidrazonas avaliadas não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas, apresentando valores de CC<sub>50</sub> superiores a 50 µM. Em adição, todas as N-acil-hidrazonas modularam a produção de nitrito, em macrófagos imortalizados, apresentando valores de inibição entre 14,4% e 74,2%. Por apresentar um melhor perfil de atividade, as N-acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 também tiveram sua citotoxicidade e efeito anti-inflamatório avaliados em culturas de macrófagos peritoneais. As moléculas não foram citotóxicas em nenhuma das concentrações testadas em macrófagos peritoneais e foram capazes de reduzir de forma significante (p < 0,05), a produção de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Interessantemente, ambas as moléculas reduziram de forma significativa a produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  em cultura de esplenócitos ativados com concanavalina A. Por último, observamos que a *N*-acil-hidrazona Fc54 a 100 mg/Kg reduziu a migração de neutrófilos (44,6%) em modelo de peritonite aguda e aumentou a sobrevida dos animais em 20% em modelo de choque endotóxico induzido por LPS. **Conclusão:** Estes achados sugerem que tais compostos apresentam potencial terapêutico para serem utilizados ao tratar enfermidades de origem inflamatória.

Palavras-chave: N-acil-hidrazonas, imunomoduladores, anti-inflamatórios.

#### ABSTRACT

SILVA, L. P. Evaluation of immunomodulatory potential of novel N-acylhydrazones (dissertation). Salvador: Department of Life Sciences, Bahia State University, 2022; 89p.

**Introduction:** *N*-acylhydrazones are promising molecules for drug prospecting due to their variety of biological activities, of which immunomodulatory activity stands out. Considering that the continuous use of immunomodulatory drugs currently available is related to several adverse effects and the aggravation of inflammatory disorders, the development of new immunomodulatory agents is necessary. **Objectives:** The present work aims to evaluate the immunomodulatory effect of novel N-acylhydrazones in vitro and in experimental models of inflammation. Materials and Methods: Initially, the cytotoxicity of the compounds was determined in macrophage cultures using the Alamar blue method. Then, the anti-inflammatory effect of the molecules on macrophages activated with LPS + IFN-y was evaluated by measuring nitric oxide and cytokines by the Griess reaction and ELISA respectively. In addition, the hemolytic capacity of the molecules was verified using human erythrocytes. To determine the immunosuppressive effect of the molecules, the production of the cytokines IL-2, IL-4 and IFN-γ was evaluated in a culture of splenocytes activated with concanavalin A. Finally, the most active molecule, Fc54, was evaluated in a model LPS-induced murine endotoxic shock and carrageenan-induced acute peritonitis. Results and discussion: The evaluated *N*-acylhydrazones did not show cytotoxicity at the concentrations tested, presenting  $CC_{50}$  values greater than 50  $\mu$ M. In addition, all N-acylhydrazones modulated nitrite production in immortalized macrophages, showing inhibition values between 14.4% and 74.2%. By presenting a better activity profile, the *N*-acylhydrazones Fc52 and Fc54 also had their cytotoxicity and anti-inflammatory effect evaluated in cultures of peritoneal macrophages. The molecules were not cytotoxic at any of the concentrations tested in peritoneal macrophages and were able to

significantly reduce (p < 0.05) the production of nitrite, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Interestingly, both molecules significantly reduced the production of IL-2 and IFN- $\gamma$  in cultured splenocytes activated with concanavalin A. Finally, we observed that *N*-acylhydrazone Fc54 at 100 mg/Kg reduced the migration of neutrophils (44.6%) in an acute peritonitis model and increased animal survival by 20% in an LPS-induced endotoxic shock model. **Conclusion:** These findings suggest that such compounds have therapeutic potential to be used to treat diseases of inflammatory origin.

Keywords: N-acylhydrazones, immunosuppressants, anti-inflammatories.

# LISTA DE ABREVIATURAS

μΜ	Micromolar
μg/mL	Micrograma por mililitro
AA	Ácido Araquidônico
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
BCR	Receptor de células B
BSA	Albumina sérica bovina cristalizada
CC50	Concentração citotóxica de 50%
CD4	grupamento de diferenciação 4
CD8	grupamento de diferenciação 8
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
DEXA	Dexametasona
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbeco
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico	
D.P	Desvio Padrão	
ELISA	Ensaio de imunoabsorbância enzimática	
E.P.M	Erro padrão da média	
GR	Receptor de glicocorticoides	
IFN-γ	Interferon gama	
IL-1	Interleucina 1	
IL-1β	Interleucina 1 beta	
IL-2	Interleucina 2	
IL-4	Interleucina 4	
IL-6	Interleucina 6	
IL-10	Interleucina 10	
IL-12	Interleucina 12	
IL-13	Interleucina 13	
IL-17	Interleucina 17	
IL-23	Interleucina 23	
LPS	Lipopolissacarídeo	
M1	Macrófago classicamente ativado	
M2	Macrófago alternativamente ativado	
mg/Kg	Miligrama por quilo	
mL	mililitro	

mM	Mili molar
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killers
nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
Pg/mL <sup>-1</sup>	Picograma por mililitro
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
SBF	Soro bovino fetal
TCR	Receptor de célula T
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócitos T auxiliar 17
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral
ТМВ	Tetrametil-benzidina

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes da imunidade inata e da imunidade adaptativa.	
Figura 2	Polarização de macrófagos M1 e M2.	
Figura 3	Mecanismo de ação dos glicocorticoides.	30
Figura 4	Comparação entre a atuação dos glicocorticoides e AINEs na cascata de metabolismo do ácido araquidônico.	32
Figura 5	Principais efeitos adversos dos AINEs nos órgãos.	33
Figura 6	A estrutura geral de hidrazonas e N-acil-hidrazonas.	34
Figura 7	Estrutura geral das N-acil-hidrazonas testadas.	37
Figura 8	Avaliação da citotoxicidade em culturas de macrófagos imortalizados ativados.	44
Figura 9	As <i>N</i> -acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 não causam alterações na integridade de eritrócitos humanos.	45
Figura 10	As <i>N</i> -acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 inibem a produção de nitrito por macrófagos ativados.	46
Figura 11	Quantificação da produção de TNF-α e IL-1β em culturas de macrófagos peritoneais tratados in vitro com a Fc52 e a Fc54.	47
Figura 12	Quantificação da produção de citocinas por esplenócitos tratados com a Fc52 e a Fc54.	48
Figura 13	Efeito da Fc54 em camundongos BALB/c desafiados com uma dose letal de LPS.	49
Figura 14	Efeito da Fc54 em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina.	50

# LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Principais diferenças entre a inflamação aguda e a inflamação crônica.	21
Citotoxicidade e efeito inibitório sobre a produção de óxidorabela 1nítrico das N-acil-hidrazonas.		43

SUM	ÁRIO	
00111		

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1		19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.	20
3.1	INFLAMAÇÃO	20
3.2	IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA	22
3.3	OS MACRÓFAGOS E SEU PAPEL NA INFLAMAÇÃO	25
3.4	DOENÇAS IMUNOMEDIADAS	27
3.5	GLICOCORTICOIDES.	29
3.6	ANTI INFLAMATORIOS NAO ESTEROIDAIS	31
3.7	N-ACIL-HIDRAZONAS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.	37
4.1	DROGAS E COMPOSTOS TESTADOS	37
4.2	ANIMAIS	38
4.3	AVALIAÇAO DA CITOTOXICIDADE	38
4.4	CULTURA DE MACROFAGOS	39
4.5		39
4.6		39
4./		40
4.8		40
4.9		41
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
_		
5		43
5.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURAS DE	13
52	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO EM CUI TUBA DE MACBÓFAGOS	40
5.3	AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM	40
0.0	FRITRÓCITOS	45
5.4	DOSAGEM DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS	46
5.5	DOSAGEM DE CITOCINAS EM CULTURAS DE ESPLENÓCITOS	48
5.6	ENSAIO DE CHOQUE ENDOTÓXICO	49
5.7	MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM MODELO DE PERITONITE	50
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO.	67

#### 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da vida, o organismo humano é exposto a uma série de agentes que podem quebrar a homeostase, sejam eles de origem patogênica ou não (CHOVATIYA; MEDZHITOV, 2014). Dentre os agentes patogênicos destacam-se bactérias, fungos, parasitas e vírus, e dentre os não patogênicos tem-se traumas, exposição a compostos tóxicos, radiação e fumo. A exposição a estes agentes culmina no surgimento da inflamação como resposta do organismo a tais estímulos nocivos (CHEN *et al.*, 2018). A inflamação consiste em uma das reações protetoras e fundamentais do organismo. Ela pode eliminar a fonte do estímulo nocivo ou da injúria tecidual ao qual o organismo está sendo submetido e envolve uma série de processos celulares e moleculares que objetivam reestabelecer a homeostase corporal (KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016).

De maneira geral, a resposta inflamatória pode ser classificada em aguda, caraterizada por alterações vasculares, presença de leucócitos e células dendríticas no local inflamado, muitas vezes garantindo a cura e o final da resposta. Ou ainda, pode classificar-se em crônica tendo em vista que há a presença de fibrose ou degeneração tecidual devido a persistência do processo inflamatório seja por sobrevivência do patógeno ou do estímulo lesivo (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; ARULSELVAN *et al.*, 2016).

É evidente a importância da inflamação para a manutenção da saúde do indivíduo. O processo inflamatório além de bem orquestrado, precisa ser bem controlado e devidamente encerrado para evitar que contribua para o surgimento de desordens metabólicas que venham a ocasionar distúrbios como diabetes e câncer (SEELAENDER *et al.*, 2015). Reporta-se que inflamações não resolvidas podem acarretar no aparecimento de uma série de doenças de caráter inflamatório que acometem uma grande parte da população como asma, artrite reumatoide e aterosclerose (ALESSANDRI *et al.*, 2013).

Atualmente, o controle da inflamação é feito com duas classes de medicamentos amplamente utilizados na prática clínica: os anti-inflamatórios não esteroidais e os glicocorticoides (PINHEIRO; WANNMACHER, 2012). Apesar de sua conhecida eficácia no tratamento de desordens inflamatórias, o uso indiscriminado

destes medicamentos por parte da população vem aumentando e junto com ele a incidência de efeitos adversos cresce também (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; DA SILVA; MENDONÇA; PARTATA, 2014).

O uso frequente de anti-inflamatórios não esteroidais provoca uma série de reações indesejadas no organismo como complicações gastrointestinais, doenças cardiovasculares e doenças renais (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). Já os glicocorticoides podem causar doenças cardiovasculares e distúrbios como a síndrome de Cushing (ORAY *et al.*, 2016; VANDEWALLE et al., 2018). Desta maneira, faz-se necessário o desenvolvimento de medicamentos eficazes e com uma menor quantidade de possíveis efeitos adversos para o manejo da inflamação, neste cenário as *N*-acil-hidrazonas surgem como alternativas promissoras.

Diversas substâncias contendo a função hidrazona são descritas na literatura, apresentando inúmeras atividades biológicas. Estas surgem como possíveis drogas pois, nos últimos anos, vêm ganhando destaque na química medicinal, devido principalmente a sua versatilidade estrutural (GUIMARÃES et al., 2017; CERQUEIRA et al., 2019).

A funcionalidade hidrazona consiste no grupo farmacofórico de inúmeras substâncias, induzindo às atividades: analgésica, anticonvulsivante e antiinflamatória (ASIF; HUSAIN, 2013; MEIRA et al., 2018). Além disso, evidências reportadas previamente na literatura demonstram que compostos orgânicos contendo a fração hidrazona são capazes de proporcionar atividade anti-inflamatória a partir da inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2, assim como anti-inflamatórios não esteroidais, evitando então a ação dos derivados do ácido araquidônico que participam de exacerbações do processo inflamatório (REIS *et al.*, 2011).

Perante o exposto, o presente estudo objetiva investigar o potencial imunomodulador de inéditas *N*-acil-hidrazonas visando propor uma possível alternativa ao controle do processo inflamatório a partir da utilização de tais compostos.

## 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador de inéditas *N*-acil-hidrazonas *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo*.

# 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade das moléculas em células de mamíferos;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório dos compostos em cultura de macrófagos estimulados com LPS + IFN-γ;
- Verificar o efeito hemolítico das moléculas mais ativas;
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos compostos mais ativos em cultura de macrófagos peritoneais ativados;
- Avaliar o efeito imunossupressor dos compostos mais ativos em cultura de linfócitos ativados;
- Verificar o efeito anti-inflamatório da molécula mais ativa em modelo murino de choque endotóxico;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório da molécula mais ativa em modelo murino de peritonite aguda.

#### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### 3.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser caracterizada como uma resposta do organismo a estímulos nocivos e danos teciduais (MEDZHITOV, 2008). Estes, podem ser causados por diversos agentes físicos (traumas, queimaduras, mudanças de temperatura), químicos (exposição a elementos tóxicos), infecciosos (bactérias, fungos, parasitas) e até mesmo fatores endógenos (células B e T autorreativas). Tais agentes desencadeiam no corpo humano uma série de eventos moleculares e celulares que combatem o agente agressor (DE MARIA; MIRANDA JUNIOR, 2020; HAWIGER; ZIENKIEWICZ, 2019).

São considerados sinais cardinais da inflamação: dor, calor, rubor, turgor e perda de função (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). A dor surge por conta da liberação de mediadores que geram estímulos a nociceptores, o calor e o rubor são causados pelo aumento da permeabilidade vascular e da vasodilatação, o turgor é ocasionado por fenômenos exsudativos e os sinais anteriores resultam na perda da função (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Na presença destes sinais, a resposta inflamatória pode efetuar a eliminação do agente causador deles, e consequentemente, a contenção do processo inflamatório garantindo que a inflamação seja localizada e restrita ao local em que está ocorrendo. Quando estes eventos são cessados de forma rápida a inflamação é considerada aguda, pois é controlada por uma resposta imediata e inespecífica (GERMOLEC *et al.,* 2018; KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016).

Neste caso, estão envolvidos os neutrófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos. É possível observar a ação dos mediadores químicos da inflamação aguda dentre eles aminas vasoativas, eicosanoides e quimiocinas, que promovem alterações celulares, maior permeabilidade dos vasos a partir do aumento do fluxo sanguíneo, ativação de leucócitos, produção de citocinas, liberação de exsudato contendo fluido e proteínas plasmáticas, afim de realizar o reparo tecidual e assim a regeneração da área atingida voltando ao estado homeostático (CRUVINEL *et al.*, 2010; FEEHAN; GILROY, 2019).

Todavia, existem casos em que os processos supracitados não são suficientes para garantir a eliminação do patógeno ou regulação da inflamação, ou

até mesmo a própria inflamação torna-se mais extensa e acaba progredindo para sua forma crônica (GERMOLEC *et al.*, 2018). A inflamação crônica diferente da inflamação aguda possui uma duração maior, apresenta angiogênese, uma maior secreção de mediadores inflamatórios, progressão da própria inflamação e recrutamento de células que não costumam atuar na inflamação aguda como os linfócitos (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2014b; ARULSELVAN *et al.*, 2016). As principais diferenças entre a inflamação crônica e a aguda estão descritas no **Quadro 1.** 

Resposta Inflamatória	Inflamação aguda	Inflamação crônica
Início	Rápido 👰	Lento 👰
Células envolvidas	Neutrófilos, Nk, C.D., macrófagos	Linfócitos, fibroblastos, macrófagos
Principais causas		Persistência do processo inflamatório
Sinais locais e sistêmicos	Eminentes	Menos evidentes

Quadro 1. Principais diferenças entre a inflamação aguda e a inflamação crônica.

Fonte: Adaptado de ABBAS, LITCHMAN, PILAI, 2014b.

O agravo da inflamação crônica pode resultar no desenvolvimento de uma resposta excessiva por parte do sistema imunológico resultando no aparecimento de doenças como a artrite reumatoide e a aterosclerose. Uma vez que o mecanismo de defesa do organismo passa a atuar também contra o tecido sadio, ocasionando um

infiltrado de células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) que por conseguinte, irão gerar fibrose e destruição.(CRUVINEL *et al.*, 2010; FEEHAN; GILROY, 2019).

Desta maneira, buscando evitar a progressão e garantir o controle da inflamação, o sistema imunológico desenvolve uma série de mecanismos de resposta a estes dois tipos de inflamação que podem ser classificados em imunidade inata e imunidade adaptativa.

#### 3.2 IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA

A imunidade inata corresponde à primeira linha de defesa do sistema imunológico a agentes lesivos e se encontra presente no organismo desde o nascimento, sua resposta é caracterizada por ser rápida e inespecífica. Ela é composta por barreiras físicas como a pele e as mucosas, barreiras celulares como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células natural killers (NK) e ainda há a participação do sistema complemento e proteínas sanguíneas a exemplo da lectina ligada à manose e a proteína C reativa (VAZ *et al.*, 2018; DELVES *et al.*, 2013).

A ativação da imunidade inata ocorre a partir de estímulos liberados por microrganismos ou por células lesionadas. No caso dos microrganismos, este estímulo é gerado pelos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), enquanto as células lesionadas possuem padrões moleculares associados aos danos (DAMPs). Estes padrões são reconhecidos pelo sistema imune inato através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em todas as células, principalmente os Receptores do tipo Toll (TLRs) importantes no reconhecimento de PAMPs como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana de bactérias (DELVES *et al.*, 2013; ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2014b).

Após o reconhecimento dos PAMPs e DAMPs pelos PRRs cascatas de sinalização capazes de desencadear a liberação de fatores recrutadores de leucócitos para a região lesada são iniciadas (NEWTON; DIXIT, 2012). Nesse cenário, o fator de necrose tumoral (TNF-α) é responsável pela ativação de células endoteliais e de neutrófilos, pela indução de febre por conta da sua ação sob o hipotálamo e pela síntese de proteínas agudas no fígado. Esta síntese também é realizada por interleucinas (IL) como a IL-1β que ainda promove o aumento da permeabilidade vascular juntamente com a IL-6, enquanto a IL-12 e o Interferon

gama (IFN-γ) ativam células NK e macrófagos (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2014a; CALICH; VAZ, 2008).

Em paralelo, ainda na imunidade inata, as quimiocinas inflamatórias são induzidas, geralmente, por microrganismos ou citocinas como TNF-α e IL-1β que orquestram a migração de células imunes para o local de inflamação e sua consequente ativação (CALICH; VAZ, 2008). Os monócitos podem migrar a partir da ação da CCL2 e da CCL7 que são produzidas após o reconhecimento de padrões ou estímulo de citocinas, a CCL3 e a CCL4 promovem a migração de macrófagos e a CXCL8 promove adesão e ativação de neutrófilos. De uma maneira geral, as quimiocinas agem controlando o tráfego das células imunes durante o processo inflamatório (PALOMINO; MARTI, 2015).

Ainda assim, a imunidade inata pode não ser suficiente para a eliminação do agente causador da inflamação, mas tem-se também a ativação da imunidade adaptativa. Esta costuma ser específica, mais lenta, possui memória e envolve eventos a nível celular e molecular após o reconhecimento do antígeno a partir da apresentação do mesmo e da ativação dos linfócitos B e T (**Figura 1**; NETEA *et al.*, 2019). O reconhecimento em questão é feito por dois receptores altamente específicos: receptor de células B (BCR) e receptor de células T (TCR), a posterior ativação das células resulta na liberação de citocinas e imunoglobulinas. Este tipo de imunidade pode ser humoral (mediada por anticorpos produzidos nos linfócitos B) ou celular (mediada pela ativação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>) (VAZ *et al.*, 2018).



Figura 1. Componentes da Imunidade Inata e da Imunidade Adaptativa. Adaptado de ABBAS; LITCHMAN; PILAI, 2014a e DRANOFF, 2004.

A imunidade humoral é composta por macromoléculas que podem ser facilmente encontradas em fluidos corporais como anticorpos que são produzidos por linfócitos B e proteínas do sistema complemento (TOMAR; DE, 2014). O reconhecimento de antígenos que anteriormente foram secretados por anticorpos permite que a imunidade humoral seja efetuada, ela é capaz de garantir a neutralização e eliminação de patógenos que circulam no meio extracelular, porém, este reconhecimento não é efetivo nos casos em que o patógeno se encontra dentro da célula (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2014b).

Já a imunidade celular, ao contrário da imunidade humoral, é mediada por linfócitos do tipo T e células fagocitárias, ela garante a sua efetividade em microrganismos que já foram fagocitados ou se encontram no interior da célula. Uma vez que os linfócitos T conseguem matar as células que estejam infectadas a partir da ação dos linfócitos T citotóxicos ou ainda através das citocinas que são produzidas pelos linfócitos T auxiliares (ABBAS, LITCHMAN, PILLAI, 2014b; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). Os linfócitos T possuem a capacidade de reconhecer uma vasta gama de antígenos sejam eles oriundos de patógenos, tumores e até mesmo do ambiente e estão envolvidos na memória imunológica e no mecanismo de auto tolerância, paralelo a isso, podem atuar como células impulsionadoras de doenças inflamatórias e autoimunes (KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018).

Uma outra característica dos linfócitos do tipo T auxiliares é a capacidade de diferenciação após o estímulo sofrido por meio de células apresentadoras de antígeno, isso impacta diretamente na função desses linfócitos. As células do tipo Th1 produzem IFN-y e IL-2 estes vão atuar na ativação dos fagócitos e na produção de alguns anticorpos, os do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13 sendo fundamentais na resposta a alérgenos, helmintos e até mesmo na cicatrização de feridas, já os linfócitos do tipo Th17 produzem a IL-17, recrutam neutrófilos para locais de infecção e medeiam respostas imunes a patógenos extracelulares (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010; GURRAM; ZHU, 2019; LEE, 2018).

Desta forma, verifica-se que a imunidade inata e a imunidade adaptativa são mecanismos de relevância para o combate a estímulos nocivos no organismo humano (TOMAR; DE, 2014). Ademais, os macrófagos demonstram-se de extrema importância para o bom funcionamento dos mecanismos de defesa, pois, são uma

das primeiras linhas de defesa contra infecções (LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020). Assim como, são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos que atuam na imunidade adaptativa, por isso, é essencial entender o papel deste tipo celular durante o processo inflamatório.

#### 3.3 OS MACRÓFAGOS E SEU PAPEL NA INFLAMAÇÃO

Os macrófagos compõem um conjunto de glóbulos brancos fagocitários oriundos dos monócitos, formados na medula óssea e gerados a partir da hematopoese que detém a capacidade de se diferenciar nos tecidos, seja por conta de condições patológicas ou até mesmo fisiológicas (MUÑOZ *et al.*, 2020). São células heterogêneas que possuem alta plasticidade e são facilmente encontradas em quase todos os tecidos do corpo humano, as micróglias no cérebro e as células de Kupffer no fígado são exemplos de macrófagos em estado homeostático (FUNES *et al.*, 2018).

Além de formas diferentes, os macrófagos apresentam também fenótipos diferentes dos quais se destacam dois: M1 e M2 (YUNNA *et al.*, 2019). Tais fenótipos são assumidos pelos macrófagos após sofrerem diferentes estímulos do microambiente que os circunda (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018).

Macrófagos M1 são considerados ativados pela via clássica e são estimulados pelo microambiente pró-inflamatório caracterizado pela presença de LPS e IFN- $\gamma$  (TARIQUE *et al.*, 2020). Durante o processo inflamatório, os macrófagos M1 constituem a principal linha de defesa contra patógenos, pois, após o reconhecimento de invasores por parte dos receptores do tipo Toll estas células realizam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ ), aumentam os níveis de óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio e facilitam a fagocitose mediada pelo sistema complemento (LEITE *et al.*, 2015; ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; **Figura 2**).

Já os macrófagos M2 costumam ser ativados pela via alternativa e são estimulados por mediadores como IL-4 e IL-13 (ITALIANI; BORASCHI, 2014). Na inflamação desempenham um papel importante na imunorregulação, respostas à parasitas, reparo tecidual e até mesmo resposta anti-inflamatória pois liberam citocinas e quimiocinas de perfil antagônico ao Th1, tais como, IL-4, IL-13, CCL17 e

CCL18 e por isso são habilidosos ao promover o reparo tecidual (FERRANTE; LEIBOVICH, 2012; TARIQUE *et al.*, 2020; **Figura 2**).



Figura 2. Polarização de macrófagos M1 e M2. Adaptado de SAQIB et al., 2018.

As citocinas pró-inflamatórias como as liberadas pelos macrófagos M1 após sua ativação, costumam estar relacionadas à indução da ciclooxigenase 2 (COX 2) (PIRES; PANCOTE; TOLEDO, 2017). Esta isoenzima é responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas durante processos inflamatórios, pois, em condições normais ela costuma ser expressa em baixas quantidades (UCHIDA, 2017). Por este motivo, inibidores desta enzima costumam ser empregados para o controle da inflamação.

Ademais, dentre as diversas funções dos macrófagos em geral, pode-se destacar a fagocitose, a participação na imunidade inata, o condicionamento da imunidade adaptativa e a apresentação de antígenos para os linfócitos T (ABBAS;

LITCHMAN; PILLAI, 2014b). Assim como a destruição de patógenos pela ação de macrófagos M1 e subsequente reparação tecidual promovida pelos macrófagos M2, desta maneira, a regulação da polarização de tais células com o objetivo de controlar a inflamação e o sistema imune vem sendo explorada (YUNNA *et al.*, 2019).

Oliveira Júnior, Portella Junior e Cohen (2016) afirmaram que a modulação de citocinas seja por inibição das pró-inflamatórias (envolvidas no estímulo de macrófagos M1) ou no aumento da produção das anti-inflamatórias (envolvidas no estímulo de macrófagos M2) demonstra eficiência no controle da dor, um dos cinco sinais cardinais da inflamação. Com a modulação da produção dos mediadores químicos supracitados, há a consequente modulação da ativação e da polarização dos macrófagos envolvidos no processo inflamatório, o que pode acarretar na diminuição do surgimento de doenças imunomediadas.

#### 3.4 DOENÇAS IMUNOMEDIADAS

São chamadas de doenças imunomediadas um conjunto de desordens que apresentam manifestações clínicas diferentes, porém uma mesma causa: a desregulação da resposta imune (ROSE, 2004). Quando a resposta imune não é controlada e finalizada de maneira efetiva, pode haver o desencadeamento das doenças imunomediadas tais quais asma, artrite reumatoide e psoríase, além de contribuir para o surgimento de câncer e neurodegeneração (TAAMS, 2018).

A capacidade do sistema imune de reconhecer e diferenciar os seus próprios antígenos de antígenos externos é chamada de auto tolerância e ela faz com que o organismo não produza reações contra proteínas do próprio corpo, além de estar envolvida em respostas exacerbadas a antígenos não-danosos e a patógenos. Com a perda dessa capacidade, há o surgimento da autoimunidade que é considerada a base patológica para doenças imunomediadas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Há uma extensa lista de enfermidades autoimunes, relata-se a existência de cerca de cem delas sendo que podem ser restritas a órgãos como é o caso da cirrose biliar primária ou sistêmicas como o lúpus eritematoso sistêmico (WANG; WANG; GERSHWIN, 2015).

Evidências na literatura reportam que anormalidades funcionais em linfócitos e macrófagos estão diretamente ligadas ao desenvolvimento de doenças autoimunes, tendo em vista que há a presença marcante de uma infiltração dessas linhagens celulares em doenças imunomediadas (NAVEGANTES *et al.*, 2017).

Reporta-se que o perfil de resposta gerado pelos linfócitos do tipo Th1 pode contribuir para a patogênese de doenças autoimunes como a artrite reumatoide. Linfócitos Th17 podem também contribuir na fisiopatologia de doenças autoimunes e são responsáveis pela produção da IL-17, uma família de citocinas que possui o papel de induzir a inflamação e promove o recrutamento de neutrófilos a partir da indução de quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL8. Sua produção descontrolada culmina no surgimento de inflamações crônicas patogênicas como a psoríase (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010; MCGEACHY; CUA; GAFFEN, 2019).

Além disto, verifica-se que macrófagos criam armadilhas extracelulares que se espalham pelos tecidos e atacam microrganismos, porém, estas armadilhas também contribuem para o surgimento de inflamações e doenças autoimunes (DOSTER *et al.*, 2017).

Ademais, acredita-se que a infiltração de fagócitos, incluindo macrófagos, no sistema nervoso central é a principal causa da destruição tecidual que ocorre na esclerose múltipla, uma doença autoimune. Na artrite reumatoide, outra doença autoimune de natureza crônica, os macrófagos são encontrados em grandes quantidades e produzem citocinas que corroboram na patogênese da doença como IL-1β, IL-6 e TNF-α (BART *et al.*, 2021).

Já na aterosclerose, é possível encontrar a presença de macrófagos do tipo M1 em placas de gordura produzindo citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para o agravo da doença (YANG *et al.*, 2020). Assim como, macrófagos em estado disfuncional encontrados em pulmões também podem contribuir para a patogênese da asma e uma série de outras doenças (BELCHAMBER; DONELLY, 2017).

Desta forma, o desequilíbrio na regulação e função dos macrófagos ou linfócitos pode ser um fator contribuinte para o surgimento de doenças autoimunes, portanto, entender o seu papel e a modulação da sua resposta são fundamentais no manejo de exacerbações da resposta imune. Por este motivo, é crescente a utilização de fármacos capazes de modular as funções desempenhadas por células do sistema imune como glicocorticoides.

#### 3.5 GLICOCORTICOIDES

Os glicocorticoides são hormônios esteroides gerados na glândula adrenal e posteriormente sintetizados nas adrenais ou suprarrenais devido à ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que realiza sua liberação e síntese (RANG *et al.*, 2016). Os glicocorticoides naturais estão incluídos em uma ampla gama de processos fisiológicos dentre os quais pode se evidenciar inflamações, metabolismo energético e imunidade, tanto na fase adulta quanto na fetal (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017; ROSIN, 2015).

Consequentemente, os glicocorticoides sintéticos possuem estrutura química similar aos naturais, agem de forma semelhante ao cortisol, hormônio endógeno, e por este motivo são bastante prescritos por médicos e bem aceitos no tratamento da inflamação, possuem também atividade imunossupressora que os tornam eficazes no tratamento de doenças como a asma e até mesmo câncer (ROSIN, 2015; ADCOCK; MUMBY, 2016).

A ligação dos glicocorticoides com os receptores de glicocorticoides (GR) presentes nas células, permite a sua entrada para o citoplasma onde há uma interação com o elemento de resposta aos glicocorticoides. Ao chegar no núcleo da célula, os glicocorticoides geram a modulação da transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório, seja para induzi-los (transativação) ou para inibi-los (transrepressão) (**Figura 3**) (BIDDIE et al., 2012).



Figura 3. Mecanismo de ação dos glicocorticoides. Fonte: Errante et al., 2015.

Além de serem utilizados para o tratamento de condições inflamatórias e doenças autoimunes, os glicocorticoides também são empregados como imunossupressores evitando respostas imunes entre hospedeiros *versus* enxerto pós transplante e como linfolíticos durante tratamentos quimioterápicos (COUTINHO; CHAPMAN, 2011).

Supõe-se que os glicocorticoides são capazes de regular cerca de 20% do genoma humano, a partir dos mecanismos de ativação ou repressão gênica. Porém, nos últimos anos, estudos têm indicado a existência de mecanismos não genômicos dos receptores de glicocorticoide e que estes receptores estão presentes na maioria das células nucleadas, mas, sua ação depende do tipo celular envolvido (CAIN; CIDLOWSKI, 2017).

Por conta de suas ações pleiotrópicas, o uso prolongado de glicocorticoides para tratamento de condições inflamatórias pode resultar em uma série de efeitos adversos por conta de suas atividades fisiológicas, dos quais podem ser citados a osteoporose, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, mudanças de humor e por consequência disso a depressão, síndrome de Cushing e face de lua cheia (ORAY *et al.*, 2016; VANDEWALLE *et al.*, 2018). Sendo assim, é importante a existência de outras opções para o tratamento de condições inflamatórias ou até mesmo controle das mesmas a exemplo de anti-inflamatórios não esteroidais.

#### 3.6 ANTI INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS

Uma alternativa para o controle da inflamação são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), eles estão entre os fármacos mais usados em todo o mundo, seja por conta de prescrição médica ou por automedicação. A larga utilização desta classe pode ser atribuída ao fato de que possuem propriedades farmacológicas analgésicas, antipiréticas e também anti-inflamatórias (PROZZI *et al.*, 2018).

Por esta razão, podem ser empregados no tratamento de uma extensa gama de enfermidades, na atenuação de sintomas como febre e dor, além disso, são empregados em pós-operatórios, em doenças autoimunes como a artrite reumatoide e em outras condições clínicas (TASNEEM, SALEEM, SAEED, 2020).

Atualmente, os AINEs são amplamente utilizados em todo o mundo como alternativa para o alívio da dor, febre, inflamação e podem ser classificados como inibidores não seletivos que são aqueles capazes de inibir a COX 1 e a COX 2, e os inibidores seletivos, que atuam exclusivamente inibindo a COX 2 (BATLOUNI, 2010; TASNEEM; SALEEM; SAEED, 2020). Porém, é necessária uma atenção ao utilizar tais medicamentos pois os mesmos podem causar sérios efeitos adversos e interações medicamentosas (PINHEIRO; WANNMACHER, 2012).

O mecanismo de ação dos AINEs consiste no bloqueio da produção de metabólitos do ácido araquidônico chamados de prostaglandinas que consequentemente irão bloquear a síntese das isoformas da enzima ciclooxigenase (ZHENG; DU, 2013).

Inicialmente, o ácido araquidônico é liberado em sua forma livre e convertido pela via das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) para mediadores químicos que atuam durante a inflamação corroborando com este processo, o ácido araquidônico é convertido em prostaglandina e posteriormente é transformado nestes principais metabólitos ativos: prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos (BACCHI *et al.,* 2012; **Figura 4**).



# Figura 4. Comparação entre a atuação dos glicocorticoides e AINEs na cascata de metabolismo do ácido araquidônico. Adaptado de SONNWEBER *et al.* 2018.

A COX-1 possui propriedades constitutivas e funções fisiológicas vitais e a COX-2 é induzida por prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias. A inibição realizada pelo AINEs nestas duas isoformas costuma ser seletiva, apesar da maioria deles ter potencial para atuar tanto na COX-1 quanto na COX-2. A ação destes fármacos interfere na vasodilatação, nos tromboxanos e reduz os sinais e sintomas da inflamação (RANG *et al.*, 2016; ROSIN, 2015).

A diversidade de efeitos benéficos que os AINEs proporcionam está diretamente ligada a inibição de prostanóides (BACCHI *et al.*, 2012). Enquanto a maioria dos efeitos adversos ocasionados pelo uso contínuo de AINEs está relacionada à inibição da COX 1, devido ao fato dessa enzima ser constitutiva e estar presente em órgãos essenciais para a manutenção da vida humana, como por exemplo, o sistema digestório (BAKER, 2018; **Figura 5**).



Figura 5. Principais efeitos adversos dos AINEs nos órgãos. Adaptado de BINDU, MAZUMDER E BANDYOPADHYAY, 2020.

No sistema digestório, os AINEs podem promover o surgimento de sintomas como petéquias, náuseas, dor e sintomas mais graves como é o caso de úlceras e hemorragia digestiva alta. Apesar dos inibidores seletivos da COX 2 apresentarem menor toxidade para o sistema gastrointestinal, estes sintomas ainda podem surgir com o uso deles, quanto maior a dose empregada, maior é o risco do aparecimento de sintomas (FLORES *et al.*, 2019). Existe uma alta incidência de eventos gastrointestinais gerados pelos AINEs e evidências mostram que isto se dá por conta da função de citoproteção gástrica da COX-1, outros efeitos adversos como cardiovasculares e renais também podem ocorrer pela inibição da COX-2 (RANG *et al.*, 2016; PROZZI *et al.*, 2018).

Os AINEs afetam também o sistema cardiovascular aumentando o risco de infarto do miocárdio, este fato levou à retirada do rofecoxibe, inibidor seletivo da COX 2, do mercado (BRAUN; BARALIAKOS; WHESTOFF, 2019). Devido à inibição da formação de prostaglandina 2 que é produto da COX 2, o equilíbrio homeostático pode ser afetado, isso resulta em desordens cardiovasculares e trombóticas, há risco potencial também para hipertensão arterial (RAHMAN; MALCOUN, 2014).

A função renal também costuma ser afetada pelos AINEs, causando lesão ou disfunção nos rins, pois as prostaglandinas atuam nestes mantendo a hemodinâmica

e gerando proteção (ZHENG; DU, 2013). Existem outros efeitos adversos causados por fármacos que promovem a inibição da COX 2, sejam eles seletivos para esta isoenzima ou não, como rash cutâneo, icterícia e risco de aborto espontâneo em gestante (SANDOVAL et al., 2017). Considerando os efeitos adversos que os AINEs promovem, é necessário verificar as melhores condições para usá-los no controle da inflamação.

#### 3.7 N-ACIL-HIDRAZONAS

As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos com estrutura geral – C=N–NH– (**Figura 6**), resultantes da condensação de substâncias carboniladas como cetonas ou aldeídos com aminas. Tais compostos e seus derivados vêm obtendo um grande destaque na literatura, nos últimos anos, por serem compostos que possuem uma estrutura química dita como privilegiada na química medicinal e também serem detentores de uma vasta gama de propriedades farmacológicas, pois interagem com diversos sistemas biológicos e pequenas mudanças em sua composição implicam em diferentes aplicações terapêuticas (GUIMARÃES *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019).



Figura 6. A estrutura geral de hidrazonas e *N*-acil-hidrazonas. Adaptado de Arruda *et al.*, 2020.

As propriedades farmacológicas das hidrazonas e das *N*-acil-hidrazonas são justificadas pela junção dos grupos funcionais amida e imina que permitem a geração de pontos farmacofóricos ideais para a ligação de hidrogênio permitindo a ligação dos compostos com um grupo extenso de resíduos oriundos de aminoácidos (LI *et al.*, 2018). Dentre as propriedades farmacológicas dos compostos hidrazônicos

estão as atividades antineoplásica associada a indução da morte por apoptose, atividade antimicrobiana, antidepressiva, prevenção da agregação plaquetária, atividade quelante, anti-inflamatória, entre outras (GUIMARÃES *et al.*, 2017; WAHBEH; MILKOWSKI, 2019).

Os compostos hidrazônicos são classificados como bases de Schiff e a sua combinação com outros grupos funcionais resulta em uma melhora significativa nas propriedades biológicas que as hidrazonas desempenham e em moléculas que se mostram serem farmacologicamente ativas, além de minimizarem a toxicidade e efeitos adversos no sistema gastrointestinal causadas por analgésicos (MEDEIROS *et al.*, 2021).

Tais compostos podem ser utilizados associados a anti-inflamatórios não esteroidais, tendo em vista que geram estabilidade química o que ocasiona a liberação regulada destes fármacos. Mudanças na estrutura das hidrazonas podem gerar diferenças na capacidade de agir sob a inflamação (WAHBEH; MILKOWSKI, 2019). Ademais, de acordo com a literatura, existem indícios de que existem compostos hidrazônicos atuando como inibidores da enzima ciclooxigenase produzindo efeito anti-inflamatório e analgésico (REIS *et al.*, 2011).

O potencial imunomodulador de *N*-acil-hidrazonas já fora investigado e notouse que além de inibir a COX, os compostos testados também desempenham funções reguladoras ao inibir a proliferação de linfócitos e a sua ativação. Ademais, um dos compostos em questão, inibiu a migração de neutrófilos em um modelo murino de peritonite aguda induzida por carragenina assim como modulou a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A e IFN-γ por macrófagos e linfócitos (MEIRA *et al.*, 2018).

Em um outro estudo, pesquisadores notaram que um derivado de *N*-acilhidrazona foi capaz de inibir a ativação de linfócitos, reduziu a produção óxido nítrico e fator de necrose tumoral em culturas de macrófagos, mostrando que o composto modulou a resposta imune destas células, ademais, o composto também inibiu a ativação da NF-κB através da inibição da fosforilação da proteína iκB e da diminuição da atividade transcricional da NF-κB, uma importante via inflamatória (GUIMARÃES *et al.*, 2018).

As *N*-acil-hidrazonas têm sido comumente empregadas como protótipo para o desenvolvimento de compostos inéditos com atividade analgésica e anti-inflamatória

devido ao fato de que esta subunidade é um farmacóforo para a ligação e inibição das enzimas ciclooxigenases, possivelmente, isso ocorre a partir da acidez relativa do hidrogênio do grupo amina ou sua capacidade de estabilizar radicais livres. Tal fato explica o grande interesse da comunidade científica nestes compostos nos últimos anos (DE MELO *et al.*, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2021).

Estudos relataram que as hidrazonas inibem tanto a via da ciclooxigenase quanto a via da lipoxigenase, apresentando atividade anti-inflamatória bem como analgésica, e por consequência, modulando a resposta imune (REIS *et al.*, 2011). Além disso, a porção hidrazida contida em hidrazonas promove a diminuição do sangramento causado por fármacos comercializados atualmente no trato gastrointestinal, gerando então uma inibição mais segura da COX (ZEESHAN *et al.*, 2019). Desta forma, tais moléculas são candidatas promissoras na busca por novas terapias para tratar doenças inflamatórias apesar da necessidade de elucidar melhor o seu mecanismo de ação.

Em síntese, considerando a necessidade de controlar o processo inflamatório e impedir o surgimento de doenças crônicas, além de evitar a série de efeitos adversos gerados pelos fármacos que costumam ser utilizados no manejo das inflamações, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas para a terapia. Neste sentido, as *N*-acil-hidrazonas demonstram grande potencial para o tratamento de condições inflamatórias e no presente estudo investigamos o potencial imunomodulador de compostos inéditos desta classe.
# **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 4.1 DROGAS E COMPOSTOS TESTADOS

A dexametasona e a violeta de genciana foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e Synth (São Paulo, SP, Brasil) respectivamente. 18 derivados de *N*-acil-hidrazonas (**Figura 7**) foram preparados por via sintética em colaboração com o Prof. Dr. José Maurício do Santos Filho, do Laboratório de Planejamento e Síntese Aplicados a Química Medicinal, Universidade Federal de Pernambuco.

Nos ensaios *in vitro* os compostos foram solubilizados primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, Espanha) e posteriormente em meio de cultura, não excedendo a concentração final de 0,1% de DMSO nos testes. Já nos ensaios *in vivo*, os compostos foram solubilizados numa mistura de 30% Sorbitol (Sigma-Aldrich) e 10% Tween 80 (Sigma-Aldrich) em salina. As soluções foram preparadas pouco tempo antes de serem utilizadas e não foram armazenadas para usos posteriores.



Figura 7. Estrutura geral das N-acil-hidrazonas testadas. Fonte: Autoria própria, 2022.

### 4.2 ANIMAIS

Camundongos BALB/c, com idade entre 4-10 semanas, foram fornecidos pelo biotério do Instituto Gonçalo Moniz e mantidos no biotério em gaiolas contendo no máximo 5 camundongos. Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*. Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde (NIH) para experimentação animal. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA (018/2015).

# 4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos compostos em teste foi determinada inicialmente em cultura de macrófagos imortalizados da linhagem J774, posteriormente os compostos mais ativos testados em culturas de macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram incubados em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço), em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 24 h em estufa a  $37^{\circ}$ C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, as *N*-acil-hidrazonas foram testadas em séries de cinco concentrações ( $3,12 - 50 \mu$ M), em triplicatas, incubadas por 72 horas em estufa a  $37^{\circ}$ C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram adicionados 20  $\mu$ L/poço de Alamar Blue® (Invitrogen, Carlsbad, CA) e uma nova incubação durante o período de 4h foi realizada. Os valores de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica de 50%) foram calculados utilizando *data-points* colhidos de três experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado violeta de genciana em concentrações variando de 0,04 a 10 $\mu$ M.

# 4.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS

Macrófagos imortalizados da linhagem J774 (2 x 10<sup>5</sup> células/poço) foram incubados em placas de 96 poços, em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 50 μg/mL de gentamicina, em triplicata, estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL), e tratados ou não com diferentes concentrações das 18 *N*-acil-

hidrazonas avaliadas. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem de óxido nítrico.

Ademais, macrófagos do exsudato peritoneal (2 x  $10^5$  células/poço) foram submetidos ao procedimento supracitado e foram mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, durante 4 e 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

# 4.5 OBTENÇÃO DE ESPLENÓCITOS

Os baços de camundongos BALB/c foram retirados após eutanásia. Em seguida, foram lavados em meio DMEM, macerados e então suas células foram centrifugadas a 400 g por duas vezes, durante 10 minutos por vez, em centrífuga refrigerada. Então, o pellet foi ressuspendido em 1mL de meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 50 µg/mL de gentamicina para a contagem de células em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas 1 x 10<sup>6</sup> células/poço em placas de 24 poços, em um volume final de 200 µL/poço de meio DMEM contendo 10% SBF, com ou sem estimulação com 5 µg/mL de concanavalina A e na presença ou não das moléculas Fc52 e Fc54. As células foram mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C. Após um período de 24h, o sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ .

# 4.6 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos foi determinada através de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). A absorbância foi determinada em leitor de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA; Spectramax), com filtro de 570 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1. Os resultados foram expressos em μM de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400 μM.

### 4.7 ENSAIO DE HEMÓLISE

Eritrócitos humanos O+ frescos (doados pela HEMOBA) foram centrifugados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS), ajustados para 1% de hematócrito e 100 μL

foram distribuídos em uma placa de fundo redondo de 96 poços. Em seguida, as hidrazonas Fc52 e Fc54 (80, 40, 20 e 10  $\mu$ M), foram adicionadas em triplicata. Hemácias não tratadas receberam 100  $\mu$ L de PBS contendo 0,5% de DMSO (controle negativo), enquanto para o controle positivo foi utilizada saponina (Sigma-Aldrich) a 1% v/v. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> e então centrifugadas a 400 g por 10 min. Um volume de 100  $\mu$ L do sobrenadante foi transferido para uma segunda placa, a qual foi lida em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 540 nm, conforme descrito em Wang et al. (2010). A porcentagem de hemólise foi calculada em comparação com os controles positivos e negativos, usando GraphPad Prisma 5.01.

#### 4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

A dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi realizada a partir do sobrenadante de macrófagos peritoneais, enquanto a dosagem das citocinas IL-2, IL-4 e IFN-y foi feita a partir do sobrenadante de esplenócitos. Foi empregada a técnica de ELISA sanduíche, utilizando kit Duoset ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapólis, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As placas de ELISA (NUNC - IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 µL/poco do anticorpo de captura, na concentração de 2 µg/mL, diluído em salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas por 24 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS a 0,05% de tween e bloqueadas com 100 µL/poço de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina cristalizada (BSA) por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 50 µL/poço das amostras, do branco e da curva padrão dos recombinantes diluídos no tampão Tris-salina (20 mM triz na base e 150 mM de NaCl) contendo 0,1% de BSA e 0,05% de tween 20, durante 2 horas, à temperatura ambiente. O padrão foi diluído seriadamente (1:2), a partir da concentração inicial de 2000 pg/mL, com 11 diluições em duplicata. As placas foram lavadas três vezes com PBS/tween 0,05% e incubadas com 50 µL do anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 400 ng/mL por um período de 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS/tween 0,05% e incubadas durante 20 minutos com avidina-peroxidase diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato tetrametil-benzidina (TMB) dissolvido em 10 mL do tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 e 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e interrompida com ácido

fosfórico a 0,05 M. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 450nm. As análises foram realizadas utilizando o Software Softmax 4.3.1.

# 4.9 MODELO DE CHOQUE ENDOTÓXICO

Camundongos BALB/c machos (14-18 g) foram previamente tratados, por via oral, com diferentes doses (50 e 100 mg/Kg) da hidrazona mais ativa (Fc54), dexametasona (25 mg/Kg) ou solução veículo (mistura de 30% Sorbitol e 10% Tween 80 em salina). Noventa minutos depois, os animais foram desafiados com 600 µg de lipopolissacarídeo (LPS; sorotipo 0111:B4 de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich) em solução salina, por via intraperitoneal. A sobrevivência dos camundongos foi então monitorada diariamente durante 4 dias.

# 4.10 MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

Camundongos BALB/c (machos, entre 4/10 semanas) foram randomizados e tratados por via oral por dois dias consecutivos com a Fc54 (100 mg/kg), dexametasona (25 mg/kg) ou solução veículo (mistura de 30% Sorbitol e 10% Tween 80 em salina). Uma hora após a segunda dose, os animais foram desafiados com uma injeção intraperitoneal de carragenina (250 µL de uma solução à 1 mg/mL). Após 4 horas da administração da carragenina, os animais foram eutanasiados e foi realizada uma lavagem peritoneal com 2,5 mL de solução salina. O volume recuperado foi equivalente a 80% do usado para o lavado e foi centrifugado para obtenção das células do aspirado. O pellet foi ressuspenso no volume final de 1 mL de PBS 1x. O número de leucócitos totais no lavado foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. As contagens diferenciais foram obtidas utilizando preparações de citospin coradas com o kit panótipo rápido (Newprov-Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR). As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica, na ampliação de 1000x por um observador cego às identidades das amostras. As contagens diferenciais foram concluídas em 300 células por lâmina, usando critérios morfológicos padrão.

# 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o one-way ANOVA para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *P*< 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

#### **5 RESULTADOS**

# 5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS

No presente estudo, verificou-se o potencial imunomodulador de 18 derivados de *N*-acil-hidrazonas em cultura de macrófagos. Inicialmente, a citotoxicidade das moléculas foi testada em macrófagos murino da linhagem J774. Como pode se observar na **Tabela 1**, todas as *N*-acil-hidrazonas testadas não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas, apresentando valores de CC<sub>50</sub> superiores a 50 μM. Sob as mesmas condições, a violeta de genciana, droga com reconhecida atividade citotóxica, apresentou um valor de CC<sub>50</sub> igual a 0,8 μM.

Compostos	СС <sub>50</sub> (µМ) <sup>а</sup> ЈЈ74	% de inibição sobre a produção de nitrito	
Fc03	>50	19,7 (± 3,0)	
Fc20	>50	49,3 (± 0,8)	
Fc25	>50	49,2 (± 1,9)	
Fc30	>50	55,2 (± 0,6)	
Fc35	>50	42,7 (± 2,7)	
Fc36	>50	49,6 (± 2,6)	
Fc37	>50	14,4 (± 2,2)	
Fc38	>50	31,2 (± 2,6)	
Fc50	>50	59,9 (± 0,3)	
Fc51	>50	56,6 (± 2,1)	
Fc52	>50	71,7 (± 3,6)	
Fc54	>50	74,2 (± 0,7)	
Fc57	>50	25,2 (± 2,1)	
Fc58	>50	55,5 (± 1,7)	
Fc63	>50	43,7 (± 3,3)	
Fc64	>50	45,2 (± 2,1)	
Fc66	>50	35,6 (± 0,7)	
Fc69	>50	46,7 (± 3,0)	
VG <sup>a</sup>	0,8 (± 0,1)	-	
Dexametasona <sup>b</sup>	-	64,9 (± 6,7)	

**Tabela 1.** Citotoxicidade e efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico das *N*-acil-hidrazonas.

Valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes. <sup>a</sup> droga citotóxica de referência. <sup>b</sup> fármaco anti-inflamatório de referência. VG = Violeta de genciana.

# 5.2 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS

Em seguida, o efeito anti-inflamatório das moléculas, na concentração de 40 μM, foi avaliado em culturas de macrófagos estimulados com LPS + IFN-γ através

da mensuração da concentração de nitrito, como indicador de produção de óxido nítrico. De acordo com a **Tabela 1**, todas as *N*-acil-hidrazonas modularam a produção de nitrito apresentando valores de inibição entre 14,4% e 74,2%. As moléculas mais ativas foram as N-acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 (Tabela 1) que apresentaram valores de inibição, na concentração de 40 µM, de 71,7% e 74,2% respectivamente. Sob as mesmas condições, a dexametasona apresentou uma inibição de 64,9% (**Tabela 1**). Por apresentar um melhor perfil de atividade frente a macrófagos imortalizados, as N-acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 também tiveram sua citotoxicidade e efeito anti-inflamatório avaliados em culturas de macrófagos peritoneais. Como demonstrado na Figura 8, as moléculas não foram citotóxicas em nenhuma das concentrações testadas, obtendo resultados similares à dexametasona na concentração de 40 µM.



**Figura 8.** Avaliação da citotoxicidade em culturas de macrófagos peritoneais. A viabilidade celular foi determinada nos sobrenadantes de culturas de macrófagos tratados ou não com as hidrazonas Fc52 e Fc54 (10, 20 e 40 μM) ou dexametasona (Dexa; 40 μM) na presença de LPS (500 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL) utilizando o método do Alamar Blue. Valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de quatro determinações obtidas de três experimentos realizados.

Em adição, ambas as moléculas induziram uma redução significativa (P < 0,001) e concentração-dependente, na produção de nitrito (**Figura 9**).



Figura 9. As *N*-acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 inibem a produção de nitrito por macrófagos ativados. Concentrações de nitrito foram determinadas nos sobrenadantes de culturas de macrófagos tratados ou não com as hidrazonas Fc52 e Fc54 (10, 20 e 40  $\mu$ M) ou dexametasona (Dexa; 40  $\mu$ M) na presença de LPS (500 ng/mL) e IFN- $\gamma$  (5 ng/mL). Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de quatro determinações obtidas em um de dois experimentos realizados. \*\*\**P*< 0,001 em comparação com culturas não tratadas e estimuladas com LPS + IFN- $\gamma$ . #*P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN- $\gamma$ . \$*P*< 0,05 em comparação com culturas estimuladas e tratadas com dexametasona.

# 5.3 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS

Posteriormente, o efeito hemolítico da Fc52 e Fc54 foi avaliado em cultura de eritrócitos humanos. Ambas as moléculas não exerceram efeito hemolítico, apresentando uma porcentagem de hemólise próxima a 0%, em todas as concentrações testadas. Sob as mesmas condições, a saponina induziu 100% de hemólise (**Figura 10**). Este dado demonstra que tanto a Fc52 quanto a Fc54 não afetam a integridade das hemácias humanas.



Figura 10. As *N*-acil-hidrazonas Fc52 e Fc54 não causam alterações na integridade de eritrócitos humanos. A porcentagem de hemólise foi determinada em hemácias obtidas de sangue humano fresco após lavagem com PBS e tratamento com as hidrazonas Fc52 e Fc54 em diferentes concentrações (10, 20, 40 e 80  $\mu$ M) em comparação com hemácias tratadas com saponina 1%. Valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de quatro determinações obtidas em um de dois experimentos realizados. \*\*\**P*< 0,001 em comparação com hemácias tratadas com saponina 1%.

### 5.4 DOSAGEM DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A fim de obter uma melhor caracterização do efeito imunomodulador dos compostos Fc52 e Fc54 sobre macrófagos peritoneais, a produção de citocinas foi mensurada empregando o método de ELISA. A estimulação dos macrófagos utilizando LPS + IFN- $\gamma$  promoveu o aumento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (**Figura 11**). Contudo, o tratamento com as moléculas reduziu significativamente (p< 0,05) os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , citocinas pró-inflamatórias. Sob as mesmas condições, a dexametasona, na concentração de 40  $\mu$ M, também promoveu a redução destas citocinas.



**Figura 11. Quantificação da produção de TN-α e IL-1β em culturas de macrófagos peritoneais tratados** *in vitro* **com a Fc52 e a Fc54**. Concentrações de TNF-α e IL-1β foram determinadas nos sobrenadantes de culturas de macrófagos peritoneais tratados ou não com as hidrazonas Fc52 e Fc54 (10, 20 e 40 µM) ou dexametasona (Dexa; 40 µM) na presença de LPS (500 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL). Valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de quatro determinações obtidas em um de dois experimentos realizados. \*\*\**P*< 0,001 em comparação com culturas não tratadas e estimuladas com LPS + IFN-γ. \*\**P*< 0,01 em comparação com culturas não tratadas e estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com LPS + IFN-γ. \**P*< 0,05 em comparação com culturas estimuladas com dexametasona.

# 5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS EM CULTURAS DE ESPLENÓCITOS

Posteriormente, a produção de citocinas em esplenócitos também foi investigada. Após o estímulo com a concanavalina A (con A), houve um aumento dos níveis da produção das citocinas IL-2, IL-4 e IFN-γ (**Figura 12**). O tratamento utilizando as hidrazonas Fc52 e Fc54 promoveu uma redução significativa e concentração-dependente da IL-2 e a Fc54 também realizou o mesmo feito na produção de IFN-γ. Por outro lado, as moléculas não promoveram a redução

significativa dos níveis de IL-4. Sob as mesmas condições, a dexametasona reduziu significativamente os níveis de IL-2, IL-4 e IFN-γ.



Figura 12. Quantificação da produção de citocinas por esplenócitos tratados com a Fc52 e a Fc54. As concentrações de IL-2 (A e B), IL-4 (C e D) e IFN- $\gamma$  (E e F) foram determinadas em sobrenadantes de culturas de esplenócitos estimulados com concanavalina A (Con A, 5 µg/mL) e tratados ou não com Fc52 e Fc54 (10, 20, 40 µM) ou dexametasona (40 µM) durante 24 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e a quantificação das citocinas foi realizada por ELISA. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M0. de quatro determinações obtidas em um experimento de dois realizados. \*\*\**P*< 0,001 em comparação com culturas não tratadas e estimuladas com Con A \**P*< 0,05 em comparação com culturas não tratadas e estimuladas com Con A. #*P*< 0,05 em

comparação com culturas não tratadas e não estimuladas com Con A. \$*P*< 0,05 em comparação com culturas estimuladas e tratadas com dexametasona.

# 5.6 ENSAIO DE CHOQUE ENDOTÓXICO

Para avaliar o efeito anti-inflamatório da molécula Fc54 nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, previamente determinadas em trabalhos anteriores do grupo, foi empregado um modelo murino de choque endotóxico induzido por uma dose letal de LPS (600 µg). A **Figura 13** demonstra o percentual de sobrevivência dos camundongos. Neste cenário, observa-se que em comparação com o grupo veículo, os animais tratados com a molécula Fc54 tiveram um tempo de sobrevivência maior, porém, no terceiro dia todos os animais tratados com a dose de 50 mg/kg já haviam morrido. No quarto dia apenas 20% do grupo tratado com a dose de 100 mg/kg havia sobrevivido, este dado se mostrou estatisticamente significante. Entretanto, a dexametasona na dose de 25 mg/kg sob as mesmas condições promoveu a sobrevida de 80%.



Figura 13. Efeito da Fc54 em camundongos BALB/c desafiados com uma dose letal de LPS. Camundongos machos BALB/c (n=10) foram pré-tratados com a Fc54 (50 e 100 mg/kg), dexametasona (25 mg/Kg) ou veículo (mistura de 30% Sorbitol e 10% Tween 80 em salina) e desafiados com 600  $\mu$ g de LPS (LD<sub>90-100</sub> = 42.8 mg/kg) 90 min depois, administrado por via

intraperitoneal. A sobrevivência foi monitorizada durante 4 dias após o desafio com LPS. Os resultados são de dois experimentos realizados de forma independente. \*P< 0,05 em comparação com o grupo veículo. \*\*P< 0,01 em comparação com o grupo veículo. A análise estatística foi realizada usando Logrank (Mantel Cox).

# 5.7 MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM MODELO DE PERITONITE

O efeito anti-inflamatório da Fc54 também foi avaliado em um modelo murino de peritonite aguda induzida por carragenina. Em comparação ao grupo tratado com veículo, o pré-tratamento feito com a hidrazona Fc54 na dose de 100 mg/Kg causou uma redução na migração de neutrófilos de 44,6 %. Sob as mesmas condições, a dexametasona, na dose de 25 mg/Kg, induziu uma redução de 55% (**Figura 14**).



Figura 14. Efeito da Fc54 em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina. Camundongos BALB/c (n=6/grupo) foram tratados com Fc54 (100 mg/Kg) ou dexametasona (25 mg/Kg) ou veículo (mistura de 30% Sorbitol e 10% Tween 80 em salina) e desafiados com uma solução de carragenina à 1%. O experimento incluiu um grupo de animais não tratados ou desafiados (Naive). Valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de seis animais em um de dois experimentos realizados. \*\*\**P*< 0,001 em comparação com o grupo veículo. #*P*< 0,05 em comparação com o grupo naïve.

# 6 DISCUSSÃO

As *N*-acil-hidrazonas correspondem a uma classe de compostos orgânicos com uma porção hidrazona que demonstram ser candidatas promissoras e versáteis para a química medicinal (THOTA *et al.*, 2018). Os compostos orgânicos derivados delas chamam atenção de pesquisadores por conta de suas propriedades químicas, e também, por desempenharem atividades biológicas que costumam ser investigadas para o desenvolvimento de novos fármacos (VERMA *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Dentre as atividades biológicas que estas moléculas apresentam, destacamse as atividades ligadas à inflamação, uma vez que estudos sugerem que a fração hidrazona dos compostos tem um caráter farmacofórico para a inibição da COX (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007). Para além disso, evidências demonstram que anti-inflamatórios não esteroidais contendo a fração *N*-acil-hidrazona são menos ulcerogênicos (DE MELO *et al.*, 2014). Em um outro estudo, o derivado de hidrazona LaSSBio-1386 demonstrou a capacidade de inibir o NF-κB, relevante via inflamatória, o que indica que este é possivelmente o mecanismo de ação das hidrazonas (GUIMARÃES *et al.*, 2018). Partindo desta premissa, objetivando a produção de fármacos eficazes e mais seguros para serem utilizados na clínica, é crescente o desenvolvimento de compostos contendo a fração hidrazona, dentre eles a série de moléculas Fc.

Na presente investigação, foi avaliado o potencial citotóxico dos 18 derivados de *N*-acil-hidrazonas testados e constatou-se que os compostos não apresentavam citotoxicidade nas concentrações testadas. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com a literatura, pois ao investigar o potencial imunossupressor de um derivado de *N*-acil-hidrazona (LASSBio-1386) em macrófagos da linhagem J774, Guimarães e colaboradores (2018) verificaram que a molécula apresentava CC<sub>50</sub> de 55  $\mu$ M utilizando também o método AlamarBlue. Meira *et al* (2018), aplicando este mesmo método, investigaram a citotoxicidade de 24 compostos derivados de *N*-acil-hidrazona e CC<sub>50</sub> entre 17,8 e >100  $\mu$ M.

O óxido nítrico (NO) é um mediador químico com papel fundamental na morte de patógenos por mácrofagos que ao ser produzido exacerbadamente promove a

morte de células saudáveis e passa a ser tóxico (COLEMAN, 2001; F. FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Neste estudo, verificou-se que os compostos reduziram a produção de NO e as moléculas Fc52 e Fc54 apresentaram um maior potencial de modulação. Anteriormente, Kaplancikli e colaboradores (2012) notaram que os derivados de hidrazonas utilizados por eles em um ensaio afim de mensurar a produção de NO em macrófagos da linhagem RAW 264.7 eram capazes de realizar a inibição deste radical.

Em seguida, afim de investigar a citotoxicidade das moléculas mais ativas (Fc52 e Fc54) frente a hemácias humanas, foi empregado um ensaio de hemólise *in vitro* onde notou-se que as moléculas promoveram menos que 1% de hemólise, ou seja, não afetavam a integridade dos eritrócitos. Em uma investigação anterior, apurou-se que o composto anti-inflamatório em teste (ENIMF), derivado de uma base de Schiff também não induziu hemólise em todas as concentrações em que foi testado (RORIZ *et al.,* 2020).

Em adição, investigou-se também o efeito das moléculas Fc52 e Fc54 em outros mediadores químicos pró-inflamatórios produzidos por macrófagos: as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Neste sentido, observou-se uma redução significativa dos níveis destas citocinas condizente com os achados da literatura (MEIRA *et al.,* 2018).

O composto SintMed65, derivado de *N*-acil-hidrazona testado por Meira e colaboradores (2018), demonstrou-se capaz de diminuir os níveis de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  de maneira dependente da concentração em comparação com culturas de esplenócitos não tratadas e estimuladas com Con A. Este feito também foi alcançado pelas moléculas aqui investigadas, pois, as mesmas reduziram os níveis de IL-2, esta citocina é fundamental no crescimento e proliferação de linfócitos T, de células efetoras e de memória, atuantes principalmente na imunidade inata. Além disso, apesar de reduzirem os níveis de IL-4, e apenas a Fc54 reduziu significativamente os níveis de IFN- $\gamma$ , citocina com atividade pró-inflamatória que atua induzindo respostas imunes e a produção de citocinas do tipo Th1 (ABBAS *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2021).

Considerando a maior potência do Fc54 sob a produção dos mediadores inflamatórios aqui investigados ela foi avaliada em modelos experimentais de

choque endotóxico induzido por LPS e peritonite aguda induzida por carragenina. O ensaio de choque endotóxico evidenciou a capacidade da Fc54 de promover uma maior sobrevida dos animais frente uma dose letal de LPS enquanto peritonite aguda induzida por carragenina diminuiu a migração de neutrófilos.

O modelo de choque endotóxico foi empregado outrora por Guimarães e pesquisadores (2018) para verificar a sobrevida de camundongos frente a uma dose letal de LPS. Sob as mesmas condições utilizadas neste estudo, o composto em questão (LaSSBio-1386) a 50 e 100 mg/kg, promoveu uma sobrevivência animal de 50 e 85%, respectivamente. Desta forma, é possível perceber que os derivados de hidrazonas apresentam efeitos imunomoduladores não somente em ensaios *in vitro* como também em modelos murinos (GUIMARÃES *et al.,* 2018). Os dados aqui apresentados sugerem que a classe Fc possuem potencial para modular a resposta imune em condições inflamatórias.

# 7 CONCLUSÃO

Em suma, no presente estudo observou-se que as *N*-acil-hidrazonas testadas não foram citotóxicas nas concentrações testadas e modularam a produção de nitrito. As duas moléculas mais ativas foram a Fc52 e a Fc54, ambas não promoveram hemólise de eritrócitos e modularam a produção de citocinas *in vitro*. Já *in vivo*, notou-se que a Fc54 aumenta a sobrevida diante de uma dose letal de LPS e reduz a migração de neutrófilos em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos. Estes achados sugerem que tais compostos apresentam potencial terapêutico para serem utilizados ao tratar enfermidades de origem inflamatória.

# REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology:** functions and disorders of the immune system. 4th. ed. Saunders, 2014a.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. 8th. ed. Saunders, 2014b. ISBN-13: 978-0323222754.

ABBAS, A. K.; TROTTA, E.; SIMEONOV, D. R.; MARSON, A.; BLUESTONE, J. A.. Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects. **Science Immunology**, [S.L.], v. 3, n. 25, p. 1-8, 20 jul. 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482.

ADCOCK, I. M.; MUMBY, S.. Glucocorticoids. Handbook Of Experimental Pharmacology, [S.L.], p. 171-196, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/164\_2016\_98.

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and Therapeutics**, vol. 139, no. 2, p. 189–212, 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006.

ARRUDA, I.; MACEDO, B.; MACEDO, J.; CAMPOS, W.; ARAŎJO, C.; GONSALVES, A.. PREPARAÇÃO DE HIDRAZONA E N-ACILIDRAZONA USANDO FÁRMACOS COMERCIAIS COMO REAGENTES: aulas práticas de síntese de compostos bioativos. **Química Nova**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 642-648, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170497.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S., GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, E.; KUMAR, S.. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2016, p. 1-15, 2016. Hindawi Limited. DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2016/5276130.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2016, 2016. DOI: https://doi.org/10.1155/2016/5276130.

ASIF, M.; HUSAIN, A.. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. **Journal Of Applied Chemistry**, [S.L.], v. 2013, p. 1-7, 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2013/247203.

ATRI, C.; GUERFALI, F.; LAOUINI, D.. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1801, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061801.

BACCHI, S.; PALUMBO, P.; SPONTA, A.; COPPOLINO, M.F.. Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: a review. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 52-64, 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.2174/187152312803476255.

BAKER, W. L. NSAIDs and Cardiovascular Toxicity. **Comprehensive Toxicology**, 341–355, 2018.

BART, V. M. T.; PICKERING, R. J.; TAYLOR, P. R.; IPSEIZ, N. Macrophage reprogramming for therapy. **Immunology**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 128-144, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/imm.13300.

BATLOUNI, M.. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0066-782x2010000400019.

BELCHAMBER, K. B. R.; DONNELLY, L. E. Macrophage Dysfunction in Respiratory Disease. **Results and Problems in Cell Differentiation**, p. 299–313, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0\_12.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U.. Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage:: a current perspective. **Biochemical Pharmacology.**, [S.I], v. 114147, n. 180, 2020.

BRAUN, J.; BARALIAKOS, X.; WESTHOFF, T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk – a matter of indication. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 2, p. 285–288, abr. 2020. DOI: http://dx.doi.org/ 10.1016/j.semarthrit.2019.07.012.

BUSADA, J. T.; CIDLOWSKI, J. A.. Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development. **Current Topics In Developmental Biology**, [S.L.], p. 147-170, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.004.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017.

CALICH, V.; VAZ, C. Imunologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2008.

CERQUEIRA, J. V.; MEIRA, C. S.; SANTOS, E. S.; FRANÇA, L. S. A.; VASCONCELOS, J. F.; NONAKA, C. K. V.; MELO, T. L.; S. FILHO, J. M.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.. Anti-inflammatory activity of SintMed65, an N-acylhydrazone derivative, in a mouse model of allergic airway inflammation. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 75, p. 105735, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105735.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico: revisão. Acta Cirurgica Brasileira, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502002000600011.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, vol. 9, no. 6, p. 7204–7218, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23208.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R.. Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 281-288, abr. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030.

COLEMAN, J. W.. Nitric oxide in immunity and inflammation. International Immunopharmacology, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00086-8.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2–13, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

CRUVINEL, W. M.; M. JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.. Sistema imunitário: parte i. fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042010000400008.

DA SILVA, J. M.; MENDONÇA, P. P.; PARTATA, A. K. Anti-inflamatórios nãoesteróides e suas propriedades gerais. **Revista Científica ITPAC**, v. 7, n. 4, p. 1–15, 2014.

DE MARIA, Y. Y. D. M.; MIRANDA JUNIOR, M. Principais Mecanismos de Ação do Sistema Imunológico e sua Resposta Relacionada a Neurodegeneração de Células do Sistema Nervoso Central e Periférico em Situações de Infecção Viral. **Revista Intersaúde**, v. 1, n. 2, p. 129–144, 2020.

DE MELO, T.; CHELUCCI, R.; PIRES, M.; DUTRA, L.; BARBIERI, K.; BOSQUESI, P.; TROSSINI, G.; CHUNG, M.; SANTOS, J.. Pharmacological Evaluation and Preparation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 5821-5837, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms15045821.

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. Fundamentos de Imunologia. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan - Grupo Gen, 2013. 568 p.

DOSTER, R. S.; ROGERS, L. M.; GADDY, J. A.; ARONOFF, D. M. Macrophage Extracellular Traps: a scoping review. **Journal Of Innate Immunity**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 3-13, 7 out. 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1159/000480373.

DRANOFF, G.. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 11-22, 2004. Springer Science and Business Media LLC. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nrc1252.

ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; TAVARES, J. G. P.; REIS, M. C. M.; ICIMOTO, M. Y., FERRAZ, R. R. N., CARICATI-NETO, A..Mecanismo de Ação e

Resistência ao Uso de Glicocorticóides. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 6, n. 2, p. 01–11, 2014.

F. FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 265-271, set. 2000. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0104-4230200000300012.

FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is Resolution the End of Inflammation? **Trends in Molecular Medicine**, vol. 25, no. 3, p. 198–214, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.01.006.

FERRANTE, C. J.; LEIBOVICH, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. **Advances in Wound Care.** vol. 1, no. 1, p. 10–16, 2012. DOI: https://doi.org/10.1089/wound.2011.0307.

FLORES, K. L. F.; ÁVILA, L. E. L.; SOLORZANO, L. B. D.; FIALLO, S. J. A. Hemorragia digestiva alta asociada a AINES. **RECIMUNDO**, v. 3, n. 3 ESP, p. 128-145, 2019.

FUNES, S. C.; RIOS, M.; ESCOBAR-VERA, J.; KALERGIS, A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, vol. 154, no. 2, p. 186–195, 2018. DOI: https://doi.org/10.1111/imm.12910.

GERMOLEC, D. R.; SHIPKOWSKI, K. A.; FRAWLEY, R. P.; EVANS, E. Markers of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1803, p. 57–79, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4\_5.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 131-138, out. 1982. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x.

GUIMARÃES, D. G.; ROLIM, L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.. Biological Potential of Synthetic Hydrazones in the Last Decade: a systematic review. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 2551-2592, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170151. GUIMARÃES, E. T.; SANTOS, T. B.; SILVA, D. K. C.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; SILVA, T. F.; SALMON, D.; BARREIRO, E. J.; SOARES, M. B. P.. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 65, p. 108-118, dez. 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2018.09.047.

GURRAM, R. K.; ZHU, J.. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 225-235, 21 fev. 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/s41423-019-0210-8.

HAWIGER, J.; ZIENKIEWICZ, J. Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. **Scandinavian Journal of Immunology**, vol. 90, no. 6, p. 0–3, 2019. DOI: https://doi.org/10.1111/sji.12812.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.

KAPLANCIKLI, Z. A.; DILEK, M.; ÖZDEMIR, A.; TURAN-ZITOUNI, G. Synthesis and Biological Evaluation of Some Hydrazone Derivatives as Anti-inflammatory Agents. **Letters In Drug Design & Discovery**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 310-315, 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.2174/157018012799129828.

KUMAR, B. V.; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L.. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 202-213, 2018. Elsevier BV. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007.

KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J.C. **Robbins patologia básica**. 9<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A.. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 11, p. 1237–1239, 2016.

LEE, G. R. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 2018.

LEITE, R.B.; SANTOS, H.B.P.; LÚCIO, P.S.C.; ALVEZ, P.M.; GODOY, G.P.; NONAKA, C.F.W.. Macrófagos e sua Relação com o Carcinoma de Células

Escamosas Oral. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 37-46, 30 jun. 2015. Instituto Educacional Piracicabano da Igreja Metodista. DOI: http://dx.doi.org/10.15600/2238-1236/fol.v25n1p37-46.

LI, L.; PENG, J.; ZHOU, W.; QIAO, H.; DENG, X.; LI, Z.; LI, J.; FU, Y.; LI, S.; SUN, K.; LIU, H.; ZHAO, W. Potent hydrazone derivatives targeting esophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 148, p. 359–371, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.033.

LIU, C.; CHU, D.; KALANTAR-ZADEH, K.; GEORGE, J.; YOUNG, H. A.; LIU, G.. Cytokines: from clinical significance to quantification. **Advanced Science**, [S.L.], v. 8, n. 15, p. 2004433, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.1002/advs.202004433.

LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, vol. 15, p. 123–147, 2020. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J.; GAFFEN, S. L. in Health and Disease. **Immunity**, vol. 50, no. 4, p. 892–906, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021.

MEDEIROS, M. A. M. B.; SILVA, M. G.; BARBOSA, J. M.; LAVOR, E. M.; RIBEIRO, T. F.; MACEDO, C. A. F.; DUARTE-FILHO, L. A. M. S.; FEITOSA, T. A.; SILVA, J. J.; FOKOUE, H. H.; ARAÚJO, C. R. M. GONSALVES, A. A.; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydrazone derivatives and their possible mechanism of action in mice. Public Library of Science One. [S.L.]. ٧. 16, n. 11. р. 0258094-7, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0258094.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol. 454, no. 7203, p. 428–435, 2008. DOI: https://doi.org/10.1038/nature07201.

MEIRA, C. S.; DOS SANTOS FILHO, J. M.; SOUSA, C. C.; ANJOS, P. S.; CERQUEIRA, J. V.; DIAS NETO, H. A.; DA SILVEIRA, R. G.; RUSSO, H. M.; WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, vol. 26, no. 8, p. 1971–1985, 2018. DOI https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.047.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P.. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos t e b. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010. Springer Science and Business Media LLC. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042010000500008.

MUÑOZ, J.; AKHAVAN, N. S.; MULLINS, A. P.; ARJMANDI, B. H. Macrophage polarization and osteoporosis: A review. **Nutrients**, vol. 12, no. 10, p. 1–16, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/nu12102999.

NAVEGANTES, K. C.; GOMES, R. D. S.; APARECIDA, P.; PEREIRA, T. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. **Journal of Translational Medicine**, p. 1–21, 2017. DOI: https://doi.org/10.1186/s12967-017-1141-8.

NETEA, M. G.; SCHLITZER, A.; PLACEK, K.; JOOSTEN, L. A. B.; SCHULTZE, J. L. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. **Cell Host and Microbe**, vol. 25, no. 1, p. 13–26, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M.. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 006049-006049, 31 jan. 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006049.

OLIVEIRA JUNIOR, J. O.; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P.. Mediadores inflamatórios da dor neuropática. **Revista Dor**, São Paulo, v. 17, n. 1, 2016. DOI: https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160045

ORAY, M.; ABU SAMRA, K.; EBRAHIMIADIB, N.; MEESE, H.; FOSTER, C. S. Longterm side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety**, vol. 15, no. 4, p. 457–465, 2016. DOI: https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743. PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C.. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082015rb3438

PINHEIRO, R. M.; WANNMACHER, L. **Uso Racional de Anti-inflamatórios Não Esteroides**. In: Uso racional de medicamentos: temas selecionados. 1. ed. Brasília: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012. p. 41–50.

PIRES, C. A., PANCOTE, C. G., TOLEDO, L.G. COX: ALVO FARMACOLÓGICO DOS AINES. **Revista Medicina**, São José do Rio Preto, p. 01-08-, 2017.

PROZZI, G. R.; CAÑÁS, M.; URTASUN, M. A.; BUSCHIAZZO, H. O.; DORATI, C.
M.; MORDUJOVICH-BUSCHIAZZO, P.. Riesgo cardiovascular de los antiinflamatorios no esteroideos. *Medicina*, v. 78, n. 5, p. 349–355, 2018.

RAHMAN, S.; MALCOUN, A. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Cyclooxygenase-2, and the Kidneys. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 41, n. 4, p. 803– 821, 2014. DOI: http://dx.doi.org/ 10.1016/j.pop.2014.09.001.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang & Dale Farmacologia. 8. ed. Saint Louis: Elsevier, 2016.

REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, K. M.; MENDES, C. C. D. B.; FARIA, A. R.; GÓES, A. J. S.; MAGALHÃES, L. R.; SILVA, T. G.. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-arilhidrazonas. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 76-81, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000100015.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910–1939, 2007. DOI: https://dx.doi.org/ 10.3390/12081910

RORIZ, B. C.; BUCCINI, D. F.; SANTOS, B. F.; SILVA, S. R. S.; DOMINGUES, N. L. C.; MORENO, S. E.. Synthesis and biological activities of a nitro-shiff base compound as a potential anti-inflammatory agent. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 148, p. 105300, maio 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105300.

ROSE, N. R. Autoimmune Disease 2002: An Overview. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2004. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1087-0024.2004.00837.x.

ROSIN, A. C. Farmacologia. Rio de Janeiro: Seses, 2015.

SANDOVAL, A. C.; FERNANDES, D. R.; SILVA, E. A.; T. JÚNIOR, A. T. O uso indiscriminado dos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES). **Revista Científica Faem**a, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 165, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.31072/rcf.v8i2.589.

SAQIB, U.; SARKAR, S.; SUK, K.; MOHAMMAD, O.; BAIG, M. S.; SAVAI, R.. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, [S.L.], v. 9, n. 25, p. 17937-17950, 3 abr. 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.24788.

SEELAENDER, M.; ROSA NETO, J. C.; PIMENTEL, G. D.; GOLDSZMID, R. S.; LIRA, F. S.. Inflammation in the Disease: mechanism and therapies 2014. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2015, p. 1-2, 2015. Hindawi Limited. DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2015/169852.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S. A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.; SAHEBKAR, A. **Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease**. v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018. DOI: https://doi.org/10.1002/jcp.26429.

SONNWEBER, T.; PIZZINI, A.; NAIRZ, M.; WEISS, G.; TANCEVSKI, I.. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 3285, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms19113285.

SOUZA, D.; SOUSA, V.; CRUZ, L.; CARNEIRO, S.; ALVES, M.; CARVALHO, F.; COSTA, M.; CORRÊA, C.; GONSALVES, A.; ARAÚJO, C.. SÍNTESE, ATIVIDADE ANTILESHMANIA E CITOTÓXICA DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE ALDEÍDOS NATURAIS. **Química Nova**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 50-57, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170440.

TAAMS, L. S.. Inflammation and immune resolution. **Clinical & Experimental Immunology,** [S.L.], v. 193, n. 1, p. 1-2, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/cei.13155.

TARIQUE, A. A.; EVRON, T.; ZHANG, G.; TEPPER, M. A.; MORSHED, M. M.; ANDERSEN, I. S. G.; BEGUM, N.; SLY, P. D.; FANTINO, E. Anti-inflammatory effects of lenabasum, a cannabinoid receptor type 2 agonist, on macrophages from cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, vol. 19, no. 5, p. 823–829, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.03.015.

TASNEEM, S.; SALEEM, M.; SAEED, S. A.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as potential ecto-nucleotide phosphodiesterase inhibitors. Brazilian Journal of **Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.

THOTA, S.; RODRIGUES, D. A.; PINHEIRO, P. S. M.; LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.. N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 28, n. 17, p. 2797-2806, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.015.

TOMAR, N.; DE, R. K. A Brief Outline of the Immune System. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 3-12, 2014. Springer New York. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8\_1.

UCHIDA, K.. HNE as an inducer of COX-2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 169–172, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.004.

VANDEWALLE, J.; LUYPAERT, A.; DE BOSSCHER, K.; LIBERT, C. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, vol. 29, no. 1, p. 42–54, 2018. DOI: 10.1016/j.tem.2017.10.010.

VAZ, A. J.; MARTINS, J. O.; TAKEI, K.; BUENO, E. C.. **Imunoensaios**: fundamentos e aplicações. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 406 p.

VERMA, G.; MARELLA, A.; SHAQUIQUZZAMAN, M.; AKHTAR, M.; ALI, M. R.; ALAM, M. M. A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69-80, 2014. DOI: https://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.129170.

WAHBEH, J.; MILKOWSKI, S.. The Use of Hydrazones for Biomedical Applications. **Slas Technology**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 161-168, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1177/2472630318822713.

WANG, L.; WANG, F.; GERSHWIN, M. E.. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. **Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 278, n. 4, p. 369-395, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/joim.12395

YANG, S.; YUAN, H.; HAO, Y.; REN, Z.; QU, S.; LIU, L.; WEI, D.; TANG, Z.; ZHANG, J.; JIANG, Z. Macrophage polarization in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, [S.L.], v. 501, p. 142-146, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.034.

YUNNA, C.; MENGRU, H.; LEI, W.; WEIDONG, C. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, vol. 877, no. 2019, p. 173090, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090.

ZEESHAN, S.; NAVEED, M.; KHAN, A.; ATIQ, A.; ARIF, M.; AHMED, M. N.; KIM, Y. S.; KHAN, S. N-Pyrazoloyl and N-thiopheneacetyl hydrazone of isatin exhibited potent anti-inflammatory and anti-nociceptive properties through suppression of NFκB, MAPK and oxidative stress signaling in animal models of inflammation. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 68, n. 7, p. 613-632, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00011-019-01245-9.

ZHENG, L.; DU, X. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Hypertension. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 69, n. 2, p. 209–211, 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s12013-013-9791-5.

# ANEXO

**Silva, Laís Peres**, Ivanilson Pimenta Santos, Dahara Keyse Carvalho Silva, Bruna Padilha Zurita Claro dos Reis, Cássio Santana Meira, Marcos Venícius Batista de Souza Castro, José Maurício dos Santos Filho, João Honorato de Araujo-Neto, Javier Alcides Ellena, Rafael Gomes da Silveira, and Milena Botelho Pereira Soares. 2022. "Molecular Hybridization Strategy on the Design, Synthesis, and Structural Characterization of Ferrocene-*N*-acyl Hydrazones as Immunomodulatory Agents" *Molecules* 27, no. 23: 8343. https://doi.org/10.3390/molecules27238343





# Article Molecular Hybridization Strategy on the Design, Synthesis, and Structural Characterization of Ferrocene-*N*-acyl Hydrazones as Immunomodulatory Agents

Laís Peres Silva<sup>1</sup>, Ivanilson Pimenta Santos<sup>2</sup>, Dahara Keyse Carvalho Silva<sup>2</sup>, Bruna Padilha Zurita Claro dos Reis<sup>2</sup>, Cássio Santana Meira<sup>1,2,3</sup>, Marcos Venícius Batista de Souza Castro<sup>4</sup>, José Maurício dos Santos Filho<sup>4</sup>, João Honorato de Araujo-Neto<sup>5</sup>, Javier Alcides Ellena<sup>5</sup>, Rafael Gomes da Silveira<sup>5,6</sup> and Milena Botelho Pereira Soares<sup>2,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Life Sciences, State University of Bahia (UNEB), Salvador 41150-000, BA, Brazil
- <sup>2</sup> Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador 40296-710, BA, Brazil
   <sup>3</sup> Institute for Innovation in Advanced Health Systems (CIMATEC ISI SAS—University Center
- SENAI/CIMATEC), Salvador 41650-010, BA, Brazil
   Laboratory of Design and Synthesis Applied to Medicinal Chemistry-SintMed®, Center for Technology and Geosciences, Federal University of Pernambuco, Recife 50740-521, PE, Brazil
- <sup>5</sup> Multiuser Laboratory of Structural Crystallography, Institute of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos 13566-590, SP, Brazil
- <sup>6</sup> Department of Chemistry, Federal Institute of Goiás, Campus Ceres, Ceres 76300-000, GO, Brazil
- Correspondence: milena.soares@fiocruz.br

Abstract: Immunomodulatory agents are widely used for the treatment of immune-mediated diseases, but the range of side effects of the available drugs makes necessary the search for new immunomodulatory drugs. Here, we investigated the immunomodulatory activity of new ferrocenyl-N-acyl hydrazones derivatives (SintMed(141–156). The evaluated N-acyl hydrazones did not show cytotoxicity at the tested concentrations, presenting  $CC_{50}$  values greater than 50  $\mu$ M. In addition, all ferrocenyl-Nacyl hydrazones modulated nitrite production in immortalized macrophages, showing inhibition values between 14.4% and 74.2%. By presenting a better activity profile, the ferrocenyl-N-acyl hydrazones SintMed149 and SintMed150 also had their cytotoxicity and anti-inflammatory effect evaluated in cultures of peritoneal macrophages. The molecules were not cytotoxic at any of the concentrations tested in peritoneal macrophages and were able to significantly reduce (p < 0.05) the production of nitrite, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . Interestingly, both molecules significantly reduced the production of IL-2 and IFN-γ in cultured splenocytes activated with concanavalin A. Moreover, SintMed150 did not show signs of acute toxicity in animals treated with 50 or 100 mg/kg. Finally, we observed that ferrocenyl-N-acyl hydrazone SintMed150 at 100 mg/kg reduced the migration of neutrophils (44.6%) in an acute peritonitis model and increased animal survival by 20% in an LPS-induced endotoxic shock model. These findings suggest that such compounds have therapeutic potential to be used to treat diseases of inflammatory origin.

Keywords: immunomodulation; endotoxic shock; acute peritonitis; N-acyl hydrazones; ferrocene

#### 1. Introduction

Throughout life, the human organism is exposed to a series of agents that can break homeostasis, whether they are pathogenic or not [1]. Among the pathogens, bacteria, fungi, parasites, and viruses stand out, while among the non-pathogenic agents there are trauma, exposure to toxic compounds, radioactivity, and smoke. Exposure to these agents culminates in the emergence of inflammation as the body responds to such harmful stimuli [2]. Inflammation is one of the body's protective and fundamental reactions. It occurs in order to eliminate the source of the noxious stimulus or tissue injury to which the



Citation: Silva, L.P.; Santos, I.P.; Silva, D.K.C.; dos Reis, B.P.Z.C.; Meira, C.S.; Castro, M.V.B.d.S.; dos Santos Filho, J.M.; Araujo-Neto, J.H.d.; Ellena, J.A.; Silveira, R.G.d.; et al. Molecular Hybridization Strategy on the Design, Synthesis, and Structural Characterization of Ferrocene-*N*-acyl Hydrazones as Immunomodulatory Agents. *Molecules* **2022**, *27*, 8343. https://doi.org/10.3390/ molecules27238343

Academic Editor: Giuseppe Manfroni

Received: 26 September 2022 Accepted: 22 November 2022 Published: 30 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). organism is being subjected and involves a series of cellular and molecular processes that aim to reestablish body homeostasis [3].

Despite its remarkable protective function, the inflammatory process, in addition to being well orchestrated, needs to be well controlled and properly terminated to prevent it from contributing to the emergence of metabolic disorders that may lead to diabetes and cancer, for example [4]. It is reported that unresolved inflammation can lead to the emergence of a series of inflammatory diseases that affect a large part of the population, such as asthma, rheumatoid arthritis, and atherosclerosis [5].

Currently, inflammation is controlled with two classes of drugs widely used in clinical practice: non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) and glucocorticoids [6,7]. Despite their known effectiveness in the treatment of inflammatory disorders, the indiscriminate use of these drugs by the population has been increasing and, along with it, the incidence of adverse effects also grows [6–9]. The frequent use of non-steroidal anti-inflammatory drugs causes a series of unwanted reactions in the body such as gastrointestinal complications, cardiovascular diseases, and kidney diseases, while glucocorticoids can cause cardiovascular disease and disorders such as Cushing's syndrome [8,9].

In this scenario, it is necessary to develop effective drugs with fewer adverse effects for the management of inflammation, and *N*-acyl hydrazones (NAHs) appear as promising alternatives. As a privileged structure in medicinal chemistry [10], the NAH scaffold is often found as a structural part of strong candidates for the control of inflammatory diseases due to their already reported action on macrophages and lymphocyte cells and in experimental models of immune diseases [11–13]. It is a Schiff base resulting from the condensation of carbonylated substances with hydrazides and constitutes a key pharmacophore for the binding and consequent inhibition of cyclooxygenases, acting as NSAIDs [14,15]. In addition, the NAH fraction provides greater stability and a safer inhibition of COX, and it is believed that this occurs from the relative hydrogen acidity of the amine group or its ability to stabilize free radicals [16,17]. As an important concept for the design of potentially bioactive compounds, molecular hybridization is a useful strategy based on the combination of pharmacophoric moieties of diverse substances to lead to a new molecule with an improved biological response when compared to the starting structural models [18,19].

Targeting the development of molecular hybrids that incorporate a second fragment of importance for the desired biological activity and remain structurally simple, the ferrocene (Fc) core was selected for the present studies, since Fc-bearing compounds are recognized for their importance in medicinal chemistry [20]. Ferrocene derivatives have been found to play an important role in the discovery of new immunomodulatory molecules [21–24], especially due to the Fc mechanisms of action, which are usually multi-modal, and rarely accessible with most organic pharmacophores. Some of the well-known mechanisms of action of ferrocene comprise direct protein inhibition, photoactivation with consequent singlet oxygen generation and cellular damage, metalation of macromolecules, and, the most common, redox activation and reactive oxygen species (ROS) formation, leading to cellular oxidative stress [25-27]. Due to the iron presence in the structure and its role in the oxidative biochemical processes, oxidative stress is the most important mechanism of action observed in bioactive ferrocene derivatives, so its association with other pharmacophoric groups has been proven to be an excellent strategy for the design of new potential biological active molecules [28]. Therefore, a series of ferrocene-N-acyl hydrazone (Fc-NAH) hybrids has been designed according to the concept in Figure 1, which fulfills our main goal of obtaining simple molecules with an accessible and easy synthetic route as well as the potential for further molecular modifications and biological studies.

Based on this premise, our group carried out the synthesis of new Fc-NAH derivatives and, in the present study, we have investigated their structural characterization by means of spectroscopic and crystallographic techniques, as well as their in vitro immunomodulatory activity, and also tested the effectiveness of the most active molecule **SintMed150** in murine models of endotoxic shock and acute peritonitis.



**Figure 1.** Molecular hybridization strategy applied to the design of ferrocene-*N*-acyl hydrazones (Fc-NAH).

#### 2. Results

The synthetic route to prepare the planned compounds **SintMed(141–156**), depicted in Scheme 1, was based on a method developed by our research group [29]. Commercially available aldehydes **1a–p** have undergone silver (I)-mediated oxidation under basic conditions [30], leading to the corresponding carboxylic acids **2a–p** as solid materials with good yields. Aryl carboxylic methyl esters **3a–p** were easily obtained by means of Fischer esterification, and thus converted into the corresponding hydrazides **4a–p** under reflux in the presence of hydrazine hydrate in excess. The key intermediate hydrazides **4a–p** and ferrocenecarboxaldehyde were reacted in the presence of cerium (III) chloride heptahydrate (CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O) as a catalyst under mild conditions, according to a method developed in our laboratory [31], in order to afford the Fc-NAH series **SintMed(141–156)** with excellent isolated yields, stereoselectivity, and high purity of crude products. The Fc-NAH were characterized using spectroscopic techniques such as nuclear magnetic resonance of hydrogen (<sup>1</sup>H NMR) and carbon-13 (<sup>13</sup>C NMR) and infrared spectroscopy (IR), as well as elemental analysis.

In addition to the assessed physical and spectroscopic data, attempts to reinforce the formation of the thermodynamically more stable *E*-isomers by means of the CeCl<sub>3</sub>-catalyzed synthesis of the Fc-NAH have included the crystallographic structure acquisition of some molecules of this series, with success for compound **SintMed149**, one of the more active molecules, confirming the proposed molecular structures and their purity. The *E*-isomer structure is clearly confirmed as observed in Figure 2.

Initially, the cytotoxicity of the molecules was tested in the J774 macrophage cell line. All evaluated ferrocenyl-*N*-acyl hydrazones did not show cytotoxicity at the tested concentrations, exhibiting  $CC_{50}$  values greater than 50  $\mu$ M (Table 1). Under the same conditions, gentian violet, used as a positive control, presented a  $CC_{50}$  value equal to 0.8  $\mu$ M.



Reagents and conditions: (a) AgNO<sub>3</sub>, KOH 7%, 60 °C, 1 h, ⋅70-90%; (b) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, reflux, 12 h, 80-95%; (c) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, EtOH, 70 °C, 1 h, 70-90%; (d) FcCHO, MeOH, 10 mol% CeCl<sub>3</sub> 7H<sub>2</sub>O, 40 °C, 0.5-2 h, 83-99%.



Scheme 1. Synthetic route for the ferrocene-*N*-acyl hydrazone derivatives.

**Figure 2.** Crystal structure of the complex **SintMed149**. The ellipsoids are represented at 30% of probability.

The anti-inflammatory effect of the molecules was initially evaluated at a concentration of 40  $\mu$ M in cultures of macrophages stimulated with LPS + IFN- $\gamma$  by analysis of nitric oxide production. As can be seen in Table 1, all Fc-NAH derivatives modulate nitrite production, showing inhibition values between 14.4% and 74.2%. The most active molecules were the ferrocenyl-*N*-acyl hydrazones **SintMed149** and **SintMed150**, which showed inhibition values of 71.7% and 74.2% respectively. Under the same conditions, dexamethasone (Dexa) showed inhibition of 64.9% (Table 1).

To further explore the anti-inflammatory potential of compounds **SintMed149** and **SintMed150**, a new set of experiments was performed using peritoneal macrophages. Initially, the cytotoxicity of the investigated compounds was evaluated in peritoneal macrophages in the presence of LPS + IFN $\gamma$ . As revealed in Figure 3, the molecules were not cytotoxic at any of the concentrations tested, as well as dexamethasone at 40  $\mu$ M.

Ar N Fe				
Compounds	R	CC <sub>50</sub> (μM) JJ74 <sup>a</sup>	Inhibition of NO (%) Production at 40 $\mu$ M <sup>b</sup>	
SintMed141	$\bigcirc$	>50	19.7 (±3.0)	
SintMed142	CI	>50	49.3 (±0.8)	
SintMed143		>50	49.2 (±1.9)	
SintMed144	NC	>50	55.2 (±0.6)	
SintMed145		>50	49.6 (±2.6)	
SintMed146	HO (H <sub>3</sub> C) <sub>3</sub> C	>50	14.4 (±2.2)	
SintMed147	F <sub>3</sub> C	>50	59.9 (±0.3)	
SintMed148	CH <sub>3</sub>	>50	56.6 (±2.1)	
SintMed149	Br	>50	71.7 (±3.6)	
SintMed150	OPh	>50	74.2 (±0.7)	
SintMed151	но	>50	25.2 (±2.1)	
SintMed152	H <sub>3</sub> CO	>50	55.5 (±1.7)	
SintMed153	O <sub>2</sub> N CI	>50	43.7 (±3.3)	
SintMed154	Č,	>50	45.2 (±2.1)	
SintMed155		>50	35.6 (±0.7)	
SintMed156	H <sub>3</sub> CO OCH <sub>3</sub>	>50	46.7 (±3.0)	
GV <sup>c</sup> Dexamethasone <sup>d</sup>		0.8 (±0.1) -	- 64.9 (±6.7)	

Table 1. Cytotoxicity and inhibitory effect on nitric oxide production of Fc-NAH SintMed(141–156).

<sup>a</sup> Cytotoxicity was evaluated on J774 macrophages exposed to compounds for 72 h by Alamar blue method. <sup>b</sup> Percent inhibition determined 24 h after incubation with compounds and LPS plus IFN- $\gamma$ . <sup>c</sup> reference cytotoxic drug. <sup>d</sup> reference immunosuppressive drug. Values represent the mean (±standard deviation) of three independent experiments. CC<sub>50</sub> = cytotoxic concentration at 50%. NO = nitric oxide. GV = gentian violet.


**Figure 3. SintMed149** and **SintMed150** did not affect peritoneal macrophage viability stimulated with LPS plus IFN $\gamma$ . Mouse peritoneal exudate macrophages stimulated or not with LPS + IFN $\gamma$  were cultured in the absence or presence of **SintMed149** (**A**) and **SintMed150** (**B**) (10, 20, and 40  $\mu$ M) or dexamethasone (Dexa; 40  $\mu$ M). Cell viability was determined by the Alamar Blue method. "-" refers to the group of untreated and unstimulated cells. C- refers to the group of untreated cells stimulated with LPS + IFN $\gamma$ . Values represent the mean (±standard deviation) of four determinations obtained from three experiments performed.

Next, the anti-inflammatory effect of both compounds was better evaluated using a concentration-response curve in peritoneal macrophages. As expected, macrophage activation with LPS plus IFN $\gamma$  increased the amount of nitrite production (Figure 4). Treatment with **SintMed149** and **SintMed150** inhibited, in a concentration-dependent manner, the production of nitrite (p < 0.05). Interestingly, the inhibitory effect of **SintMed149** and **SintMed150** was also observed in the production of the pro-inflammatory cytokines TNF and IL-1 $\beta$  (p < 0.05) (Figure 5). Under the same conditions, dexamethasone, at a concentration of 10  $\mu$ M, also promoted the reduction of these cytokines and nitrite (Figures 4 and 5).



**Figure 4.** Ferrocenyl-*N*-acyl hydrazones **SintMed149** and **SintMed150** inhibit nitrite production by activated macrophages. Nitrite concentrations were determined in macrophage culture supernatants treated or not with hydrazones **SintMed149** (**A**) and **SintMed150** (**B**) (10, 20, and 40  $\mu$ M) or dexamethasone (Dexa; 10  $\mu$ M) in the presence of LPS (500 ng/mL) and IFN- $\gamma$  (5 ng/mL). Values represent the mean ( $\pm$ standard deviation) of four determinations obtained in one of three experiments performed. \*\*\*\* *p* < 0.001 compared to untreated and LPS + IFN- $\gamma$ -stimulated cultures. # *p* < 0.05 compared to untreated and stimulated cultures with LPS + IFN- $\gamma$ . \$ *p* < 0.05 compared to dexamethasone-treated and stimulated cultures.





**Figure 5.** Assessment of cytokine production by peritoneal macrophages treated with **SintMed149** or **SintMed150**. Mouse peritoneal exudate macrophages stimulated or not with LPS + IFN- $\gamma$  were cultured in the absence or presence of **SintMed149** (**A**,**C**) or **SintMed150** (**B**,**D**) (10, 20, and 40  $\mu$ M) or dexamethasone (Dexa; 10  $\mu$ M). Cell-free supernatants were collected after 4 h for TNF $\alpha$  quantification (A and B) or 24 h for IL-6 quantification (C and D). "-" refers to the group of untreated and unstimulated cells. C- refers to the group of untreated cells stimulated with LPS + IFN $\gamma$ . Values represent the mean (±standard deviation) of four determinations obtained in one of three experiments performed. \*\*\* *p* < 0.001 compared to stimulated and untreated cells; \*\* *p* < 0.01 compared to stimulated and untreated cells; \*\* *p* < 0.05 compared to determination of determination of cells; \*\* *p* < 0.05 compared to determinated cells; \*\* *p* < 0.05 compared to determination determination cells; \*\* *p* < 0.05 compared to determinated cells; \*\* *p* < 0.05 compared t

To investigate the immunosuppressive activity of **SintMed149** and **SintMed150**, the levels of IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  were evaluated in the supernatant of cultures of splenocytes stimulated with concanavalin A. As shown in Figure 6, stimulation with concanavalin A induced a significant increase in the production levels of the cytokines IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$ . Treatment using the hydrazones **SintMed149** and **SintMed150** promoted a significant and concentration-dependent reduction of IL-2 and **SintMed150** also performed the same feat in the production of IFN- $\gamma$ . However, the molecules did not significantly reduce IL-4 levels. Under the same conditions, dexamethasone significantly reduced the levels of IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  (Figure 6).



**Figure 6.** Assessment of cytokine production by splenocytes treated with **SintMed149** and **SintMed150**. The concentrations of IL-2 (**A**,**B**), IL-4 (**C**,**D**), and IFN- $\gamma$  (**E**,**F**) were determined in cell-free supernatants from splenocyte cultures stimulated with concanavalin A (Con A, 5 µg/mL) and treated or not with **SintMed149** and **SintMed150** (10, 20, 40 µM) or dexamethasone (10 µM) for 24 h. Culture supernatants were collected and cytokine quantification was performed by ELISA. Values represent the mean (±standard deviation) of four determinations obtained in one of three experiments performed. \*\*\* *p* < 0.001 compared to untreated and Con A-stimulated cultures \*\* *p* < 0.05 compared to untreated and unstimulated cultures with Con A. \$*p* < 0.05 compared to dexamethasone-treated and stimulated cultures.

After the in vitro results, we investigated the toxicity effect of a single dose of the compound SintMed150 in BALB/c mice. Administration of 50 or 100 mg/kg of SintMed150 did not cause mortality or the appearance of any sign of toxicity in animals (Table 2). In addition, no difference in body weight was observed in animals treated with SintMed150 when compared to vehicle-treated mice (Table 3).

Observations **Behavior and General** SintMed150 SintMed150 Appearance Vehicle (50 mg/kg) (100 mg/kg) Changes in the eyes No changes No changes No changes Changes in the fur No changes No changes No changes Changes in the skin No changes No changes No changes Coma Absent Absent Absent Convulsions Absent Absent Absent Diarrhea Absent Absent Absent Lethargy Absent Absent Absent Absent Absent Absent Salivation Sleep Usual Usual Usual Tremors Absent Absent Absent

Table 2. Effect of SintMed150 on behavioral and general appearance of male BALB/c mice.

The animals were observed daily for 14 days.

Table 3. Body weight of BALB/c mice treated with the compound SintMed150.

Days	Vehicle	SintMed150 (50 mg/kg)	SintMed150 (100 mg/kg)
0	21.6 (±1.3)	20.9 (±1.1)	20.1 (±0.8)
7	21.8 (±1.0)	21.1 (±1.1)	20.4 (±0.7)
14	22.3 (±1.1)	21.7 (±0.9)	21.0 (±0.7)

Values represent the mean  $\pm$  standard deviation of six animals per group.

Then, we tested the compound SintMed150 in a murine model of endotoxic shock induced by a lethal dose of LPS. As shown in Figure 7, in comparison with the vehicle group, the animals treated with the compound **SintMed150** had a longer survival time, despite, on the third day, all the animals treated with the dose of 50 mg/kg having already died. On the fourth day, only 20% of the group treated with the 100 mg/kg dose survived, this finding being statistically significant (p < 0.05). Under the same conditions, dexamethasone, at a dose of 25 mg/kg, promoted a more significant survival rate (83.3%).

Lastly, the anti-inflammatory effect of SintMed150 was evaluated in a murine model of carrageenan-induced acute peritonitis. As can be seen in Figure 8, animals stimulated with carrageenan and treated with vehicle solution had a high number of neutrophils in the peritoneal lavage. Compared to the vehicle-treated group, pretreatment with SintMed150 at 100 mg/kg caused a reduction in neutrophil migration of 44.6%. Under the same conditions, dexamethasone, at a dose of 25 mg/kg, induced a reduction of 55% in neutrophil migration (Figure 8).



**Figure 7.** Survival curve of mice treated with **SintMed150** and submitted to endotoxic shock. Mice were orally treated with **SintMed150** at doses of 50 mg/kg ( $\checkmark$ ) and 100 mg/kg ( $\blacktriangle$ ), or dexamethasone at a dose of 25 mg/kg ( $\blacksquare$ ), or vehicle ( $\bullet$ ). Survival was monitored for 4 days after LPS challenge. The results are from two experiments performed independently. \* *p* < 0.05 compared to the vehicle group. \*\* *p* < 0.01 compared to the vehicle group. Statistical analysis was performed using Logrank (Mantel Cox).



**Figure 8.** Effect of **SintMed150** in a carrageenan-induced model of acute peritonitis. BALB/c mice (n = 5/group) were treated with **SintMed150** (100 mg/kg) or dexamethasone (Dexa; 25 mg/kg) or vehicle (solution containing 30% sorbitol, 10% Tween 80, and 60% saline) and challenged with 1% carrageenan solution. The naïve group consists of untreated and unchallenged animals. Values represent the means  $\pm$  S.D. of six mice/group. \*\*\* p < 0.001 compared to the vehicle group; # p < 0.05 compared to naïve group.

# 3. Discussion

The derivatives **SintMed(141–156**) were characterized by usual spectroscopic techniques, namely IR, <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR, with structural assignments assisted by DEPT, HSQC, and HMQC experiments, confirming the structures and stereochemical features for each compound. <sup>1</sup>H NMR analysis of crude Fc-NAH derivatives has revealed that only the *E*-isomer was formed, in agreement with previously reported outcomes for other compounds synthesized using this method. In addition to the mild condition and low reaction time, cerium (III) chloride catalysis has proved to be highly stereoselective, leading exclusively to the *E*-isomers [31]. All compounds from this series exhibit a clear and easy pattern of signals in agreement with previously reported works, mainly based upon the analysis of the signals observed for the amidic (-CONH-) and iminic (-N=CH-) groups, which are singlets [29]. However, N-acyl hydrazones may exist as conformers due to the influence of some structural features of the substituents linked to the amidic carbonyl. It was ascertained that electron-withdrawing effects acting on an aromatic ring, ortho-substituents, or the linkage to non-aromatic substituents can destabilize the resonance effects involving the –CONH– portion, favoring the possible emergence of rotamers. Signal duplication for Fc-NAH derivatives due to rotamery has been observed for the hydrogen atoms of the -CONH- and -N=CH- moieties and agreed with reported results from the literature [32,33]. Additionally, the Fc signals can also split due to the rotamery. The signal duplication does not follow a standard behavior, so different patterns can appear for different compounds, which are completely described in the Supplementary Materials. The crystal structure of compound SintMed149 shows the E-configuration, confirming the stereochemical analysis based on NMR studies. It is also important to notice that this specific molecule is not planar throughout the aryl-*N*-acyl hydrazone backbone, corroborating the works of Lopes et al. [32] and da Silva et al. [33], which explain the nature of the rotamery observed for this compound (Supplementary Materials Figure S1). Any structural and/or electronic factors disrupting the resonance are at the origin of the rotamery observed for some members of the Fc-NAH series.

*N*-acyl hydrazones have been widely used in medicinal chemistry due to their ability to act on several molecular targets and ease of synthesis; therefore, the development of new NAH hybrids is an attractive strategy for drug design and discovery [34]. Several studies report the ability of NAH to modulate cells and inflammatory mediators of the immune response for in vitro and in vivo models of immune disorders [35,36]. The association with the ferrocene scaffold is a recognized strategy to enhance biological responses [37] and was expected to work well in our approach.

In this study, the immunomodulatory potential of 16 new Fc-NAH derivatives was investigated. The evaluated molecules presented non-cytotoxicity in the tested concentration, which reinforces the safety profile of the class, previously demonstrated in several cell lines, such as mouse splenocytes from BALB/c mice and J774 macrophages [11,13,38]. Meira et al. (2018) [13], using the same method described in this report, investigated the cytotoxicity of 24 *N*-acyl hydrazones and obtained CC<sub>50</sub> values between 17.8 and >100  $\mu$ M in the same cell line used in this report.

Knowing that nitric oxide (NO) is a key mediator of the inflammatory response, it is essential to verify the modulation of its production performed by the new compounds [39], as disclosed in Table 1. It was found that all tested Fc-NAH hybrids reduced the production of NO; however, some structural features seem to affect the activity, depending upon the aromatic moiety. **SintMed141** (phenyl) has exhibited 19.7% of NO inhibition production and was chosen as comparing parameter. Inspecting Table 1, only one compound has presented a poorer activity, namely derivative **SintMed146** (3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxyphenyl) with an inhibition of 14.4%. The influence of the bulkiness of the *t*-butyl group on the biological response seems to be fundamental, especially in comparison to compounds **SintMed151** (3,4,5-trihydroxyphenyl) and **SintMed152** (3,4,5-trihymethoxyphenyl), both similarly substituted but more active with 25.2% and 55.5% of inhibition, respectively. The substitution at the *meta* position of the phenyl ring reduces unequivocally the NO

production inhibition, as observed for compounds SintMed153 (2-hydroxy-5-nitrophenyl, 43.7%) and SintMed154 (3-chlorophenyl, 45.2%), both with activities lower than 50%. Heterocyclic aromatic rings such as in Fc-NAH hybrids SintMed143 (2-furanyl) with 49.2% and SintMed145 (2-quinolinyl) with 49.6% and the ring-fused compound SintMed155 (1-naphthyl) with 35.6% of NO inhibition suggest that this kind of substitution is related to moderate-to-poor biological responses. However, the *para* substitution at the phenyl ring seems to exert a positive effect on the inhibition of the NO production, as can be ascertained by compounds SintMed144 (4-cyanophenyl, 55.2%) and SintMed147 (4-trifluoromethylphenyl, 59.9%). A set of four molecules has disclosed the most important outcomes for the whole series. Bearing ortho substituents, compounds SintMed142 (2-chlorophenyl, 49.3%), SintMed148 (2-tolyl, 56.6%), SintMed149 (2-bromophenyl, 71.7%), and SintMed150 (2-phenoxyphenyl, 74.2%) have brought to light the importance of this substitution pattern to the enhancement of the biological response and suggested that the lipophilic character of the *ortho*-substituent is directly responsible for the inhibition of the NO production. The remarkable results found for SintMed149 and SintMed150 are higher than the control drug dexamethasone and arouse the interest of further investigation of their immunomodulatory profiles.

These data corroborate with previous investigations, in which *N*-acyl hydrazone derivatives have been shown to be effective in reducing nitric oxide production in macrophage cultures stimulated with LPS plus IFN- $\gamma$ , at concentrations ranging from 2.5 to 30 µM [11,13]. The previously studied compound **SintMed65**, derived from NAH and tested by Meira and collaborators (2018) [13], was able to decrease the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) produced by macrophages during the inflammatory process. TNF- $\alpha$ is considered the "master regulator" of inflammatory responses, it is mainly produced by macrophages, and orchestrates the production of other inflammatory mediators, as well as macrophages and lymphocytes for injured tissues [40], while IL-1 $\beta$  has potent pro-inflammatory activity and is crucial for the body's defense against infections and injuries [41]. Here, it was observed that compounds **SintMed149** and **SintMed150** also promoted a significant reduction in TNF and IL-1 $\beta$  production.

Evidence shows that the hydrazone fraction of the compounds has a pharmacophoric character for the inhibition of cyclooxygenase (COX) and that non-steroidal anti-inflammatory drugs containing the NAH fraction are less ulcerogenic [16,42]. The hydrazone derivative LaSSBio-1386 demonstrated the ability to inhibit the phosphorylation of the i $\kappa$ B protein, promoting a negative regulation of NF- $\kappa$ B, a relevant inflammatory pathway, whose inhibition is related to the decrease in cytokine production and inflammatory response [11]. Other derivatives such as *N*-pyrazoloyl hydrazone of isatin and *N*-thiopheneacetyl hydrazone of isatin decreased the translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus and suppressed the MAPK pathway, evidenced by a decrease in p-38, JNK, and ERK protein production, which interferes with the production of the TLR4 signaling pathway in macrophages that induces the activation of NF- $\kappa$ B [44]. These findings encourage further investigations with NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways to understand the mechanism of action of ferrocene-*N*-acyl hydrazone.

Then, it was found that **SintMed149** and **SintMed150** decreased IL-2 and IFN- $\gamma$  levels and neither of the two molecules reduced IL-4 levels. IL-2 promotes the growth, differentiation, and maturation of lymphocytes and IFN- $\gamma$  promotes apoptosis in infected cells and activates macrophages and NK cells [45,46]. Moraes et al. (2018) [36] obtained similar results when investigating the anti-inflammatory potential of indole-*N*-acyl hydrazone derivatives in murine splenocyte cultures.

The endotoxic shock model was previously used by Guimarães and colleagues (2018) [13] to verify the survival of mice in the face of a lethal dose of LPS. Under the same conditions used in this study, the compound in question (LaSSBio-1386), at 50 and 100 mg/kg, promoted an animal survival of 50 and 85%, respectively. Previously, the anti-inflammatory activity of NAH derivatives from the inhibition of cell migration in murine models of the sub-

cutaneous air pocket and carrageenan-induced acute peritonitis was demonstrated [21,22]. The data presented here suggest that Fc-NAH molecules have the potential to modulate the immune response in inflammatory conditions.

## 4. Materials and Methods

# 4.1. Chemistry

All solvents and reactants were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Fluka (Carvalhaes, Alvorada, RS, Brazil), Vetec (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ, Brazil), and Acros Chemicals (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and were used without further purification. The reactions' progresses were monitored by thin-layer chromatography (TLC), performed onto glass-backed plates of silica gel 60 F254 with gypsum from Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and all compounds were detected by ultraviolet light (254 nm). Melting points were determined with a capillary apparatus Gehaka PF 1500 Farma (Gehaka, São Paulo, SP, Brazil) and are uncorrected. NMR spectra were recorded at 400 MHz for hydrogen and 100 MHz for carbon, using a Varian UNMRS 400 spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA), or at 300 MHz for hydrogen and 75 MHz for carbon nuclei, using a Varian Unitplus 300 NMR (Varian, Palo Alto, CA, USA). Analyses were determined in DMSO- $d_6$  with chemical shift values ( $\delta$ ) in parts per million (ppm) and coupling constants (*J*) in Hertz (Hz) and measured at 25 °C. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C assignments were assisted by 2D experiments, such as DEPT full edit, HMBC, and HSQC. The description of the results was based on the IUPAC numbering and name recommendations. IR spectra were recorded on a Tensor27 FTIR spectrometer from Bruker (Bruker, Billerica, MA, USA) or a Spectrum 400 FTIR-FTNIR spectrometer from Perkin Elmer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) with the samples being analyzed as KBr pellets. Elemental analyses were performed in a Perkin Elmer 2400 Series L elemental analyzer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). All spectra are available in the Supplementary Materials section.

# 4.2. Preparation of Aryl Carboxylic Acids 2a-p [30]

In a 100 mL round-bottom flask, 20 mmol of silver nitrate was suspended in 60 mL of potassium hydroxide aqueous solution (7%), which was stirred for 5 min before 10 mmol of the appropriate aldehydes **1a**–**p** was added into the suspension. The mixture was stirred at 60 °C for 1 h, then cooled to room temperature, and filtered. The filtrate was acidified with a hydrochloric acid solution (10%) until the formation of a precipitate, which was cooled in an ice bath, filtered out, and dried under vacuum. The crude products were characterized by comparing their melting points with literature values as well as by <sup>1</sup>H NMR analysis. Yields have ranged from 70 to 90%, and all solid products were directly used in the next step without further purification.

### 4.3. Preparation of Aryl Carboxylate Methyl Esters 3a-p [29]

In a 100 mL round-bottomed flask, 6 mmol of crude carboxylic acids **2a–p** was placed with 30 mL of methanol. Then, 2 mL of concentrated sulfuric acid was added dropwise under vigorous stirring, and the solution was allowed to reflux overnight. After cooling to room temperature, the methanol was removed at a rotary evaporator to afford an oil, which was dissolved in ethyl acetate (30 mL), and extracted with saturated aqueous sodium carbonate (3 × 30 mL), followed by saturated sodium chloride (1 × 30 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered off, prior to solvent removal, and drying under vacuum to afford crude esters as oils or solids, in yields ranging from 80 to 95%. <sup>1</sup>H NMR data were found to agree with literature reports so that crude products could undergo the next reaction.

# 4.4. Preparation of Aryl Carbo Hydrazides 4a–p [29]

In a 50 mL round-bottomed flask, 5 mmol of the corresponding methyl esters **3a**–**p** and 2 mL of ethanol were placed. Then, 2 mL of hydrazine hydrate (55%) was dropped

under stirring, and the solution was allowed to reflux overnight. After cooling to room temperature, the reaction mixture was placed in an ice bath and filtered to afford crude products as solids in yields from 70 to 90%. Based on <sup>1</sup>H NMR data and melting point measurements, the solid hydrazides could be reacted directly in the next step.

### 4.5. Preparation of Ferrocenyl-N-acyl Hydrazones SintMed(141–156)

To a stirred suspension of 1 mmol of appropriate hydrazide and 1 mmol of ferrocenecarboxaldehyde in 10 mL of methanol was added 10 mol-% cerium (III) chloride heptahydrate and the reaction mixture was stirred at 40 °C during 10–30 min. The reaction's completion was monitored by TLC. Once concluded, the heating was put away, and 10 mL of water was added to the medium. After standing at the refrigerator, vacuum filtration was carried out, and the solid was washed with cold water/ethanol 1:1 followed by cold water. <sup>1</sup>H NMR analysis of all crude products confirmed their purity and, in a few cases, residual methanol ( $\delta$  3.16 ppm) can be observed. Recrystallization from dioxane/water mixture afforded the pure products for biological purposes. Yields, melting points, and spectroscopic and elemental analysis data are listed below for each compound.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)benzohydrazide **SintMed141**:  $R_f 0.50$  (AcOEt/Hexanes 1:1), red powder, 0.93 mmol, 93%, mp 178.8–180.5 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $v_{max} \text{ cm}^{-1}$ ): 3441, 3226 (CONH), 3063 (Ar CH), 1646 (C=O), 1607 (C=C), 1557 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm): 11.5 (s, 1H, CONH), 8.29 (s, 1H, N=CH), 7.89 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, Ar H-2,6), 7.57 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, Ar H-4), 7.52 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, Ar H-3,5), 4.66 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.46 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.24 (s, 5H, Cp-H); ); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm): 162.3 (1C, C=O), 149.0 (1C, N=CH), 133.6 (1C, Ar C-1), 131.3 (1C, Ar C-4), 128.3 (2C, Ar C-3,5), 127.4 (2C, Ar C-2,6), 78.8 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.1 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FeN<sub>2</sub>O: C, 65.08; H, 4.86; N, 8.43; found: C, 65.01; H, 4.80; N, 8.51.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)-2-chlorobenzohydrazide **SintMed142**:  $R_f$  0.56 (AcOEt/ Hexanes 1:1), red powder, 0.91 mmol, 91%, mp 156.8–158.1 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3181 (CONH), 2993 (aliphatic CH), 1641 (C=O), 1598 (C=C), 1547 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm,  $\approx$ 1.8:1 rotamers mixture): 11.65 (s, CONH minor), 11.57 (s, 1H, CONH), 8.12 (s, 1H, N=CH), 7.88 (s, N=CH), 7.55–7.41 (m, 4H, Ar, and minor), 4.66 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.46 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.34 (s, N=CH-Cp H-2,5 minor), 4.31 (s, N=CH-Cp H-3,4 minor), 4.23 (s, 5H, Cp-H), 4.15 (s, Cp-H minor); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm,  $\approx$ 1.8:1 rotamers mixture): 167.8 (CONH minor), 161.7 (1C, CONH), 149.1 (1C, N=CH), 144.5 (N=CH minor), 136.1 (Ar C-1 minor), 135.3 (1C, Ar C-1), 131.1, 130.3, 130.2, 129.8, 129.6, 129.2, 128.7, 128.5, 127.1, 126.7 (5C, Ar, and minor), 78.8 (N=CH-Cp C-1 minor), 78.5 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.2 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 69.7 (N=CH-Cp C-3,4 minor), 68.9 (5C, Cp), 68.8 (5C, Cp minor), 67.6 (2C, N=CH-Cp C-2,5), 67.1 (2C, N=CH-Cp C-2,5 minor); Anal Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>2</sub>ClO: C, 58.97; H, 4.12; N, 7.64; found: C, 58.86; H, 4.18; N, 7.54.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)furan-2-ylcarbohydrazide **SintMed143**:  $R_f 0.46$  (AcOEt/ Hexanes 1:1), dark-red powder, 0.91 mmol, 91%, mp 220.8–222.5 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3215 (CONH), 2925 (aliphatic CH), 1651 (C=O), 1606 (C=C); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm): 11.5 (s, 1H, CONH), 8.28 (s, 1H, N=CH); 7.92 (s, 1H, Furyl H-5), 7.25 (s, 1H, Furyl H-3), 6.68 (s, 1H, Furyl H-4), 4.64 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.44 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.22 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm): 153.6 (1C, CONH), 149.1 (1C, N=CH), 146.8 (1C, Furyl C-2), 145.4 (1C, Furyl C-5), 114.3 (1C, Furyl C-3), 111.9 (1C, Furyl C-4), 78.7 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.1 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 59.66; H, 4.38; N, 8.70; found: C, 59.57; H, 4.45; N, 8.78.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-4-cyanobenzohydrazide **SintMed144**:  $R_f$  0.50 (AcOEt/ Hexanes 1:1), red powder, 0.98 mmol, 98%, mp 236.0–237.9 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3354, 3229 (CONH), 3090 (Ar CH), 2227 (C $\equiv$ N), 1650 (C=O), 1611 (C=C), 1565 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm): 11.8 (s, 1H, CONH), 8.31 (s, 1H, N=CH), 8.05 (br s, 2H, Ar), 8.02 (br s, 2H, Ar), 4.67 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.45 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.22 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm): 160.9 (1C, CONH), 150.2 (1C, N=CH), 137.6 (1C, Ar C-1), 132.4 (2C, Ar), 128.3 (2C, Ar), 118.2 (1C, CN), 113.7 (1C, Ar C-4), 78.4 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.3 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.6 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>3</sub>O: C, 63.89; H, 4.23; N, 11.76; found: C, 63.99; H, 4.18; N, 11.71.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)quinolin-2-ylcarbohydrazide **SintMed145**:  $R_f$  0.66 (AcOEt/Hexanes 1:1), red powder, 0.91 mmol, 91%, mp 227.1–228.7 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3238 (CONH), 3050 (Ar CH), 1664 (C=O), 1600 (C=C), 1533 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm): 11.9 (s, 1H, CONH), 8.60 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, Quinoline H-4), 8.52 (s, 1H, N=CH), 8.21 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, Quinoline H-3), 8.20 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, Quinoline H-8), 8.11 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, Quinoline H-5), 7.92 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, Quinoline H-7), 7.75 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, Quinoline H-6), 4.69 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.48 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.27 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm): 159.7 (1C, C=O), 150.6 (1C, N=CH), 150.0 (1C, Quinoline C-2), 145.8 (1C, Quinoline C-8a), 137.9 (1C, Quinoline C-4), 130.5 (1C, Quinoline C-7), 129.1 (1C, Quinoline C-8), 128.8 (1C, Quinoline C-3), 78.7 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.2 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 69.0 (5C, Cp), 67.6 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>FeN<sub>3</sub>O: C, 65.82; H, 4.47; N, 10.96; found: C, 65.75; H, 4.52; N, 11.03.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-3,5-*tert*-butyl-4-hydroxybenzohydrazide **SintMed146**: *R*<sub>f</sub> 0.76 (AcOEt/Hexanes 1:1), red powder, 0.97 mmol, 97%, mp 256.2–258.4 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3627, 3610 (br OH), 3507, 3223 (CONH), 3082 (Ar CH), 2912 (aliphatic CH), 1640 (C=O), 1607 (C=C), 1556 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm): 11.3 (s, 1H, CONH), 8.29 (s, 1H, N=CH), 7.63 (s, 3H, OH, and Ar H-2,6), 4.64 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.43 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.22 (s, 5H, Cp-H), 1.42 (s, 18H, 2x<sup>t</sup>Bu); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm): 163.3 (1C, C=O), 156.9 (1C, Ar C-4), 148.2 (1C, N=CH), 138.3 (2C, Ar C-3,5), 124.8 (1C, Ar C-1), 124.2 (2C, Ar C-2,6), 79.2 (1C, N=CH-Cp C-1), 69.9 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.4 (2C, N=CH-Cp C-2,5), 34.5 (2C, *C*<sup>t</sup>Bu), 30.1 (6C, <sup>t</sup>Bu); Anal Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 67.83; H, 7.01; N, 6.08; found: C, 67.89; H, 6.94; N, 6.13.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-4-(trifluoromethyl)benzohydrazide **SintMed147**:  $R_f$  0.74 (AcOEt/Hexanes 1:1), red powder, 0.99 mmol, 99%, mp 220.9–222.5 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $v_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3355, 3201 (CONH), 3083, 3053 (Ar CH), 1657 (C=O), 1608 (C=C), 1564 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm): 11.7 (s, 1H, CONH), 8.32 (s, 1H, N=CH), 8.10 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, Ar H-2,6), 7.90 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, Ar H-3,5), 4.68 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.47 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.24 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm): 161.1 (1C, C=O), 150.0 (1C, N=CH), 137.4 (1C, Ar C-1), 131.3 (q, 1C, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 31 Hz, Ar C-4), 128.3 (2C, Ar C-2,6), 125.3 (2C, Ar C-3,5), 126.1 (q, 1C, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 200 Hz, CF<sub>3</sub>), 78.5 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.2 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.6 (2C, N=CH-Cp C-2,5); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ F ppm): -61.2 (s, 1F, CF<sub>3</sub>); Anal Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>2</sub>F<sub>3</sub>O: C, 57.03; H, 3.78; N, 7.00; found: C, 56.99; H, 3.83; N, 7.03.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-2-methylbenzohydrazide **SintMed148**:  $R_f 0.55$  (AcOEt/ Hexanes 1:1), red powder, 0.93 mmol, 93%, mp 207.9–209.8 °C (from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $v_{max} \text{ cm}^{-1}$ ): 3174 (CONH), 3056 (Ar CH), 2991 (aliphatic CH), 1643 (C=O), 1600 (C=C), 1559 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm,  $\approx$ 7:3 rotamers mixture):11.4 (s, 1H, CONH, and minor), 8.15 (s, 1H, N=CH), 7.89 (s, N=CH minor), 7.43–7.29 (m, 4H, Ar H-3,4,5,6, and minor), 4.64 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.44 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.36 (s, N=CH-Cp H-2,5 minor), 4.31 (s, N=CH-Cp H-3,4 minor), 4.23 (s, 5H, Cp-H), 4.17 (s, Cp-H minor), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.30 (s, CH<sub>3</sub> minor); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm,  $\approx$ 7:3 rotamers mixture): 170.5 (CONH minor), 164.4 (1C, CONH), 148.4 (1C, N=CH), 144.0 (N=CH minor), 136.1, 135.6, 135.4, 134.4, 130.4, 129.6, 129.4, 128.7, 127.24, 127.17, 125.4, 124.9 (6C, Ar, and minor), 78.9 (N=CH-Cp C-1 minor), 78.8 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.0 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 69.6 (N=CH-Cp C-3,4 minor), 68.8 (5C, Cp), 68.7 (Cp minor), 67.4 (2C, N=CH-Cp C-2,5), 67.0 (N=CH-Cp C-2,5 minor), 19.23 (CH<sub>3</sub> minor), 19.18 (1C, CH<sub>3</sub>); Anal Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>FeN<sub>2</sub>O: C, 65.92; H, 5.24; N, 8.09; found: C, 65.99; H, 5.20; N, 8.15.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)-2-bromobenzohydrazide **SintMed149**:  $R_f 0.70$  (AcOEt/ Hexanes 1:1), red powder, 0.87 mmol, 87%, mp 163.4–165.8 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $v_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3190 (CONH), 3055 (Ar CH), 1656 (C=O), 1600 (C=C), 1562 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm,  $\approx$ 2:1 rotamers mixture): 11.6 (s, CONH minor), 11.5 (s, 1H, CONH), 8.11 (s, 1H, N=CH), 7.87 (s, N=CH minor), 7.71 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, Ar H-6), 7.68 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, Ar H-6 minor), 7.54–7.37 (m, 3H, Ar H-3,4,5, and minor), 4.66 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.46 (s, 2H, <sup>3</sup>*J* = 2.8 Hz, N=CH-Cp H-3,4), 4.34 (s, N=CH-Cp H-2,5 minor), 4.31 (s, N=CH-Cp H-3,4 minor), 4.24 (s, 5H, Cp-H), 4.16 (s, Cp-H minor); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm): 162.5 (1C, CONH), 149.0 (1C, N=CH), 144.4 (N=CH minor), 137.5, 132.7, 131.9, 131.2, 130.2, 129.2, 128.5, 127.6, 127.1 (5C, Ar C-1,3,4,5,6, and minor), 119.4 (1C, Ar C-2), 78.9 (N=CH-Cp C-1 minor), 78.6 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.2 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 69.7 (N=CH-Cp C-2,5 minor); Anal Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>2</sub>BrO: C, 52.59; H, 3.68; N, 6.81; found: C, 52.52; H, 3.71; N, 6.90.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-2-phenoxybenzohydrazide **SintMed150**:  $R_f 0.65$  (AcOEt/ Hexanes 1:1), red powder, 0.83 mmol, 83%, mp 177.9–179.5 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $v_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3308 (CONH), 3060 (Ar CH), 1661 (C=O), 1602 (C=C), 1541 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm,  $\approx$ 7:3 rotamers mixture): 11.45 (s, CONH minor), 11.38 (s, 1H, CONH), 8.14 (s, 1H, N=CH), 7.84 (s, N=CH minor), 7.67–6.98 (m, 9H, Ar and OPh, and minor), 4.62 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.42 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.39 (s, N=CH-Cp H-2,5 minor), 4.32 (s, N=CH-Cp H-3,4 minor), 4.20 (s, 5H, Cp-H), 4.12 (s, Cp-H minor); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm,  $\approx$ 7:3 rotamers mixture): 167.9 (CONH minor), 161.1 (1C, CONH), 156.5, 153.0 (2C, Ar), 148.4 (1C, N=CH), 144.2 (N=CH minor), 131.7, 130.4, 130.2, 129.8, 129.6, 128.8, 128.6, 127.5, 123.6, 123.4, 123.1, 122.9, 120.1, 119.1, 118.4, 118.3, 118.0 (10C, Ar, OPh, and minor), 78.9 (N=CH-Cp C-1 minor), 78.7 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.1 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 69.7 (N=CH-Cp C-3,4 minor), 68.8 (5C, Cp), 68.7 (Cp minor), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5), 67.1 (N=CH-Cp C-2,5 minor); Anal Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 67.94; H, 4.75; N, 6.60; found: C, 67.87; H, 4.82; N, 6.65.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-3,4,5-trihydroxybenzohydrazide **SintMed151**: *R*<sub>f</sub> 0.10 (AcOEt), red powder, 0.96 mmol, 96%, mp 305.3–306.0 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3552–3000 (br, OH), 3225 (CONH), 3084 (Ar CH), 1633 (C=O), 1608 (C=C), 1570 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm): 11.2 (s, 1H, CONH), 9.13 (s, 2H, 3,5-OH), 8.77 (s, 1H, 4-OH), 8.23 (s, 1H, N=CH), 6.90 (s, 2H, Ar H-2,6), 4.62 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.42 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.21 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm): 162.5 (1C, C=O), 147.8 (1C, N=CH), 145.4 (2C, Ar C-3,5), 136.6 (1C, Ar C-4), 123.6 (1C, Ar C-1), 106.9 (2C, Ar C-2,6), 79.2 (1C, N=CH-Cp C-1), 69.9 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.4 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 56.87; H, 4.24; N, 7.37; found: C, 56.82; H, 4.31; N, 7.32.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide **SintMed152**:  $R_f$  0.18 (AcOEt/Hexanes 1:1), red powder, 0.90 mmol, 90%, mp 237.8–239.5 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3235 (CONH), 3083 (Ar CH), 2942 (aliphatic CH), 1646 (C=O), 1608 (C=C), 1582 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm): 11.4 (s, 1H, CONH), 8.32 (s, 1H, N=CH), 7.23 (s, 2H, Ar H-2,6), 4.66 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.45 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.23 (s, 5H, Cp-H), 3.86 (s, 6H, 3,5-OCH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 3H, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm): 161.8 (1C, C=O), 152.6 (2C, Ar C-3,5), 149.1 (1C, N=CH), 140.2 (1C, Ar C-4), 128.7 (1C, Ar C-1), 105.0 (2C, Ar C-2,6), 78.8 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.1 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5), 60.0 (1C, 4-OCH<sub>3</sub>), (2C, 3,5-OCH<sub>3</sub>); Anal Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 59.73; H, 5.25; N, 6.63; found: C, 59.65; H, 5.22; N, 6.70.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide **SintMed153**:  $R_f 0.18$  (AcOEt/Hexanes 1:1), yellow powder, yield 86%, mp 221.4–222.6 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3379, 3328, 3255 (CONH, OH), 3095 (Ar CH), 1630 (C=O), 1558 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm,  $\approx$ 2:1 rotamers mixture): 13.6 (s, 1H,

CONH), 9.23 (s, 1H, Ar H-6), 9.11 (s, Ar H-6 minor), 8.37 and 8.35 (2s, 1H, Ar H-4 major and minor), 8.12 (s, 1H, N=CH), 7.34 (s, 1H, Ar H-3), 4.50 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.38 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.16 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>, δC ppm): 167.1 (1C, CONH), 149.0 (1C, N=CH), 136.1 (1C, Ar C-2), 134.4 (1C, Ar C-5), 128.1 (1C, Ar C-4), 127.4 (1C, Ar C-6), 126.3 (1C, Ar C-1), 120.9 (1C, Ar C-3), 78.7 (1C, N=CH-Cp C-1), 69.9 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.8 (5C, Cp), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 54.99; H, 3.85; N, 10.69; found: C, 54.92; H, 3.84; N, 10.74.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)-3-chlorobenzohydrazide **SintMed154**:  $R_f$  0.53 (AcOEt/ Hexanes 3:7), red powder, yield 98%, mp 225.7–228.2 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3196 (CONH), 3063 (Ar CH), 1643 (C=O), 1608 (C=C), 1568 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm): 11.6 (s, 1H, CONH), 8.29 (s, 1H, N=CH), 7.95 (s, 1H, Ar H-2), 7.86 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, Ar H-6), 7.65 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, Ar H-4), 7.55 (t, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, Ar H-5), 4.67 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.46 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.23 (s, 5H, Cp); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm): 160.8 (C=O), 149.7 (N=CH), 135.6 (1C, Ar C-3), 133.1 (1C, Ar C-1), 131.2 (1C, Ar C-4), 130.3 (1C, Ar C-5), 127.1 (1C, Ar C-2), 126.2 (1C, Ar C-6), 78.6 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.2 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FeN<sub>2</sub>ClO: C, 58.97; H, 4.12; N, 7.64; found: C, 59.04; H, 4.09; N, 7.58.

(*E*)-*N*'-(Ferrocenylmethylidene)-1-naphtylcarbohydrazide **SintMed155**:  $R_f$  0.68 (AcOEt/ Hexanes 1:1), red powder, yield 93%, mp 233.0–234.4 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3185 (CONH), 3035 (Ar CH), 2977, 2845 (aliphatic CH), 1636 (C=O), 1617 (C=C), 1564 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ H ppm): 11.7 (s, 1H, CONH), 8.24–8.22 (m, 1H, Naphtyl), 8.20 (s, 1H, N=CH), 8.08 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, Naphtyl), 8.03–8.00 (m, 1H, Naphtyl), 7.74 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, Naphtyl), 7.61–7.58 (m, 3H, Naphtyl), 4.68 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.47 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.26 (s, 5H, Cp-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ C ppm): 163.9 (C=O), 148.9 (N=CH), 133.1, 133.0, 130.2, 130.0, 128.2, 126.8, 126.3, 125.6, 125.1, 124.9 (10C, Naphtyl), 78.8 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.1 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.5 (2C, N=CH-Cp C-2,5); Anal Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>FeN<sub>2</sub>O: C, 69.13; H, 4.75; N, 7.33; found: C, 69.21; H, 4.73; N, 7.36.

(*E*)-*N*<sup>'</sup>-(Ferrocenylmethylidene)-2,4-dimethoxybenzohydrazide **SintMed156**:  $R_f 0.32$  (AcOEt/Hexanes 1:1), red powder, yield 87%, mp 123.9–126.6 °C (dec, from dioxane/H<sub>2</sub>O 1:1); IR (KBr,  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>): 3223 (CONH), 3083 (Ar CH), 2836 (aliphtic CH), 1641 (C=O), 1603 (C=C), 1561 (C=N); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ H ppm): 11.4 (s, 1H, CONH), 8.30 (s, 1H, N=CH), 7.55 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, Ar H-5), 7.48 (s, 1H, Ar H-3), 7.07 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, Ar H-6), 4.65 (s, 2H, N=CH-Cp H-2,5), 4.44 (s, 2H, N=CH-Cp H-3,4), 4.23 (s, 5H, Cp-H), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ C ppm): 161.8 (C=O), 151.4 (1C, Ar C-4), 148.5 (1C, Ar C-2), 148.2 (N=CH), 125.6 (Ar C-1), 120.7 (1C, Ar C-5), 110.9 (1C, Ar C-6), 110.7 (1C, Ar C-3), 79.0 (1C, N=CH-Cp C-1), 70.0 (2C, N=CH-Cp C-3,4), 68.9 (5C, Cp), 67.4 (2C, N=CH-Cp C-2,5), 55.5 (2C, 2xOCH<sub>3</sub>); Anal Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FeN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 61.24; H, 5.14; N, 7.14; found: C, 61.16; H, 5.15; N, 7.09.

### 4.6. X-ray Crystallographic Analysis

Single crystals of compound **SintMed149** were grown by slow evaporation of an acetone/dichloromethane (1:1) solution. The X-ray diffraction experiment was performed at 100 K on a Rigaku Synergy-S diffractometer (Applied Rigaku Technologies, Inc., Austin, TX, USA) with Mo K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073$  Å). The CrysAlisPro 1.171.42.67a program (CrysAlisPRO, Oxford Diffraction / Agilent Technologies UK Ltd., Yarnton, UK) was used for data collection, cell refinement, data reduction, and gaussian method absorption correction. The structure was solved and refined using the software SHELXT2015 [47] and refined by SHELXL2015 [48] hosted on the OLEX2 program [49]. All atoms, except hydrogen, were identified and refined by least-squares full matrix F<sup>2</sup> with anisotropic thermal parameters. The crystallographic tables and the structure representations were generated by OLEX2. Details of the single-crystal X-ray diffraction experiment can be found

in the Supplementary Materials as well as on the CCDC database (www.ccdc.cam.ac.uk/, accessed on 12 September 2022) free of charge under deposit number 2214776.

### 4.7. Drugs

Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), a synthetic glucocorticoid, was used as a positive control in immunomodulatory assays. Gentian violet (Synth, São Paulo, SP, Brazil) was used as a positive control in the cytotoxicity assays. All compounds were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO; PanReac, Barcelona, Spain) and diluted in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL; Waltham, MA, USA) for use in the in vitro assays. The final concentration of DMSO was less than 0.1% in all in vitro experiments. For in vivo assays, the compounds were solubilized in a solution containing 30% sorbitol (Sigma-Aldrich), 10% Tween 80 (Sigma-Aldrich), and 60% saline.

## 4.8. Animals

Male BALB/c mice, aged between 4–8 weeks, were provided by the animal breeding facility of Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, and maintained in sterilized cages with controlled temperature ( $22 \pm 2 \,^{\circ}$ C) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ), water ad libitum, and receiving a balanced diet for rodent. The experiments and procedures with animals were approved by the institution's committee on the ethical handling of laboratory animals (approved number: L-IGM-018/15).

### 4.9. Cytotoxicity to Mammalian Cells

J774 macrophages were seeded into 96-well plates at a cell density of  $1 \times 10^4$  cells/well in a DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) and 50 µg/mL of gentamicin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After that time, each compound was added in six concentrations (50–1.56 µM), in triplicate, and incubated for 72 h. At the end of treatment, 20 µL/well of Alamar Blue (Invitrogen) was added to the plates for 4 h. using a SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

As a positive control, gentian violet was used at concentrations ranging from 0.04 to  $10 \mu$ M. CC<sub>50</sub> values were calculated using data from three independent experiments.

The second set of experiments was performed using peritoneal macrophages activated with LPS (500 ng/mL, Sigma-Aldrich) and IFN $\gamma$  (5 ng/mL; Sigma-Aldrich).

Peritoneal exudate macrophages were obtained by washing, with a cold DMEM medium, the peritoneal cavity of BALB/c mice 4–5 days after injection of 3% thioglycolate (Sigma-Aldrich) in saline (1.5 mL per mouse). Cells were seeded into 96-well plates at a cell density of  $1 \times 10^5$  cells/well in a DMEM medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL of gentamicin and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After that time, each sample was added (12.5, 25, and 50 µM), in triplicate and incubated for 72 h. At the end of treatment, 20 µL/well of Alamar Blue (Invitrogen) were added to the plates for 10 h. Colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm using a SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### 4.10. Macrophage Cultures

Immortalized J774 macrophages (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) or peritoneal macrophages (2 × 10<sup>5</sup> cells/well) were incubated in 96-well plates in a DMEM medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL of gentamicin, in triplicate, stimulated or not with LPS (500 ng/mL) and IFN- $\gamma$  (5 ng/mL), and treated or not with different concentrations of the evaluated ferrocenyl-*N*-acyl hydrazones. The cells were incubated for 4 or 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cell-free supernatants were collected after 4 h (for TNF $\alpha$  measurement) and 24 h (for IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and nitrite quantifications), and kept at -80 °C until use.

## 4.11. Splenocyte Cultures

BALB/c splenocyte suspensions were prepared in a DMEM medium supplemented with FBS and gentamicin. Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/well) were plated in 24-well plates, in triplicate, and stimulated or not with concanavalin A (Con A;  $5 \mu g/mL$ , Sigma-Aldrich). To evaluate lymphocyte function, splenocytes were activated in the absence or presence of various concentrations of **SintMed149** and **SintMed150** (10, 20, and 40  $\mu$ M). After 24 h of treatment, cell-free supernatants were collected and kept at -80 °C until use.

# 4.12. Assessment of Cytokine and Nitric Oxide Production

The dosage of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, and TNF $\alpha$  was performed from the supernatant of peritoneal macrophages or splenocytes were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using DuoSet kits from R&D Systems, according to the manufacturer's instructions. Nitric oxide production was estimated in macrophage culture supernatants harvested at 24 h using the Griess method for nitrite quantification [50].

### 4.13. Acute Toxicity in Mice

Male BALB/c mice (6–8 weeks of age; n = 6/group) were randomized into three groups and treated orally with a single dose of **SintMed150** (50 or 100 mg/kg) or vehicle (solution containing 30% sorbitol, 10 % Tween 80, and 60% saline). Animals were monitored for signs of general toxicity for 2 weeks after treatment. Observations involved changes in eyes, fur, and skin, and the occurrence of tremors, salivation, convulsions, diarrhea, sleep, lethargy, and coma. Body weights were taken and recorded at days 0, 7, and 14.

## 4.14. LPS-Induced Endotoxin Shock

Groups of five male BALB/c mice (4 weeks of age) were used for the LPS lethality assays. Mice were treated with different doses of **SintMed150** (50 or 100 mg/kg), dexamethasone (25 mg/kg), or vehicle (solution containing 30% sorbitol, 10% Tween 80, and 60% saline), by intraperitoneal (i.p.) route. Ninety minutes later, animals were challenged with 600  $\mu$ g of LPS (from serotype 0111:B4 *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich) in saline, by i.p. route. The survival rate was then monitored daily during 4 days.

#### 4.15. Induction of Acute Peritonitis in Mice

Male BALB/c mice (6–8 weeks of age; n = 6/group) were randomized into three groups and treated orally with **SintMed150** (100 mg/kg), dexamethasone (25 mg/kg), or vehicle (solution containing 30% sorbitol, 10 % Tween 80, and 60% saline) 24 and 1 h before the challenge. Next, animals were challenged with a 250 µL injection of carrageenan (1 mg/mL; intraperitoneal route). After 4 h, animals were euthanized and peritoneal exudates were harvested by peritoneal lavage using 2.5 mL of saline solution. Cells were centrifuged at 400× g for 10 min, at 4 °C. The pellet was resuspended in saline (1 mL). Total leukocytes in the peritoneal fluid were determined in a Neubauer chamber after dilution in Trypan blue stain. Differential counting of neutrophils was carried out in rapid panotype-stained cytospin preparations. A differential count of 300 cells was made in a blinded fashion and according to standard morphologic criteria.

#### 4.16. Statistical Analysis

To determine the cytotoxicity concentration of 50% of J774 macrophages (CC<sub>50</sub>), we used non-linear regression. One-way analysis of variance and Newman–Keuls multiple comparison tests were employed by using Graph Pad Prism version 8.0.1 (Graph Pad Software; San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when the values of p were < 0.05. The data are representative of at least two or three experiments.

# 5. Conclusions

The investigation of the immunomodulatory potential of the series Fc-NAH has led to the successful discovery of 16 new bioactive molecules designed on the basis of molecular hybridization, while some structure–activity relationships (SAR) have arisen from the analysis of the outcomes. A structural pattern seems to be closely associated with the most active compounds, namely the *ortho* substitution at the phenyl ring. Additionally, the presence of a phenyl ring appears to be essential for achieving better biological responses. The data presented here demonstrate that **SintMed** molecules can modulate the immune response in inflammatory conditions by decreasing the production of inflammatory mediators such as IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, nitric oxide, and TNF- $\alpha$ , without affecting cell viability. Furthermore, oral administration of the **SintMed150** derivative significantly increased the survival rate of mice in a model of endotoxic shock induced by LPS and decreased inflammatory cell migration in a peritonitis model induced by carrageenan. These findings suggest that the class of ferrocene-*N*-acyl hydrazones has therapeutic potential and may be useful in the development of drugs to treat inflammatory conditions.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27238343/s1, S2–S9: Characterization of the ferrocenyl-*N*-acyl hydrazones **SintMed(141–156)**, S10–S44: Spectroscopic data: NMR and IR spectra of Fc-NAH **SintMed(141–156)**, S45–S47: X-ray crystallographic data of **SintMed149**.

**Author Contributions:** L.P.S.: performed experiments, data analysis, and writing of the original draft of the manuscript. I.P.S.: performed experiments, instrument handling, acquisition, and analysis of data. D.K.C.S.: performed experiments and wrote the original draft of the manuscript. B.P.Z.C.d.R.: performed experiments, instrument handling, and data analysis. C.S.M.: conceived and designed the experiments and supervised them. M.V.B.d.S.C.: performed experiments and provided intellectual input into the study. J.M.d.S.F.: manuscript writing, editing, and formatting. J.H.d.A.-N.: performed experiments, acquisition, and analysis of data. J.A.E.: performed experiments, acquisition, and analysis of data. Manuscript writing and editing. M.B.P.S.: provided intellectual input into the study and proofread the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from CNPq (grant numbers 562655/2010-7 and 312505/2021-3), FAPESP (grant numbers 2017/15840-0 and 2021/04876-4), and PRONEX (grant number 0002/2014).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Eliete de Fátima V. B. N. da Silva and the Analytical Centre of Fundamental Chemistry Department, Federal University of Pernambuco, for the NMR, IR, and elemental analysis experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

 $CC_{50}$ : cytotoxicity concentration of 50%; COX: cyclooxygenase; IFN $\gamma$ : interferon gamma; IL: interleukin; LPS: lipopolysaccharide; NAH: *N*-acyl hydrazones; NO: nitric oxide; NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory agents; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha.

#### References

- 1. Chovatiya, R.; Medzhitov, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. Mol. Cell 2014, 54, 281–288. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory responses and inflammationassociated diseases in organs. *Oncotarget* 2017, 14, 7204–7218. [CrossRef] [PubMed]
- Kuprash, D.V.; Nedospasov, S.A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Biochmestry* 2016, 81, 1237–1239. [CrossRef] [PubMed]
- Seelaender, M.; Rosa-Neto, J.C.; Pimentel, G.D.; Goldszmid, R.S.; Lira, F.S. Inflammation in the disease: Mechanism and therapies 2014. *Mediat. Inflamm.* 2015, 2015, 169852. [CrossRef] [PubMed]

- 5. Alessandri, A.L.; Sousa, L.P.; Lucas, C.D.; Rossi, A.G.; Pinho, V.; Teixeira, M.M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharm. Ther.* **2013**, *139*, 189–212. [CrossRef] [PubMed]
- 6. Ronchetti, S.; Migliorati, G.; Bruscoli, S.; Riccardi, C. Defining the role of glucocorticoids in inflammation. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 1529–1543. [CrossRef]
- Bacchi, S.; Palumbo, P.; Sponta, A.; Coppolino, M.F. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 2012, 11, 52–64. [CrossRef]
- 8. Bindu, S.; Mazumder, S.; Bandyopadhyay, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem. Pharmacol.* 2020, *180*, 114147. [CrossRef]
- Oray, M.; Samra, K.A.; Ebrahimiadib, N.; Messe, H.; Foster, C.S. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin. Drug Saf.* 2016, 15, 457–465. [CrossRef]
- Verma, G.; Marella, A.; Shaquiquzzaman, M.; Akhtar, M.; Ali, M.R.; Alam, M.M. A review exploring biological activities of hydrazones. J. Pharm. Bioallied Sci. 2014, 6, 69–80.
- Guimarães, E.T.; Santos, T.B.; Silva, D.K.C.; Meira, C.S.; Moreira, D.R.M.; Silva, T.F.; Salmon, D.; Barreiro, E.J.; Soares, M.B.P. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. *Int. Imunopharmacol.* 2018, 65, 108–118. [CrossRef] [PubMed]
- Cequeira, J.V.; Meira, C.S.; Santos, E.S.; França, L.S.A.; Vasconcelos, J.F.; Nonaka, C.K.V.; Melo, T.L.; Filho, J.M.S.; Moreira, D.R.M.; Soares, M.B.P. Anti-inflammatory activity of SintMed65, an N-acylhydrazone derivative, in a mouse model of allergic airway inflammation. *Int. Imunopharmacol.* 2019, 75, 105735. [CrossRef]
- Meira, C.S.; Filho, J.M.S.; Sousa, C.C.; Anjos, P.S.; Cerqueira, J.V.; Neto, H.A.D.; Silveira, R.G.; Russo, H.M.; Wolfender, J.L.; Queiroz, E.F.; et al. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-*N*-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 1971–1985. [CrossRef] [PubMed]
- Gundla, R.; Shaik, B.B.; Gorantla, V. N-Acyl Hydrazones: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents (NSAIDs), 1st ed.; LAP LAMBERT Academic Publishing: Hyderabad, India, 2021; pp. 1–112.
- Kajal, A.; Bala, S.; Sharma, N.; Kamboj, S.; Saini, V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. Int. J. Med. Chem. 2014, 2014, 761030. [CrossRef] [PubMed]
- De Melo, T.R.F.; Chelucci, R.C.; Pires, M.E.L.; Dutra, L.A.; Barbieri, K.P.; Bosquesi, P.L.; Trossini, G.H.G.; Chung, M.C.; Santos, J.L. Pharmacological Evaluation and Preparation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 5821–5837. [CrossRef]
- 17. Medeiros, M.A.M.B.; Gama, E.; Silva, M.; De Menezes Barbosa, J.; Martins de Lavor, É.; Ribeiro, T.F.; Macedo, C.A.F.; De Souza Duarte-Filho, L.A.M.; Feitosa, T.A.; De Jesus Silva, J.; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydrazone derivatives and their possible mechanism of action in mice. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0258094. [CrossRef]
- Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr. Med. Chem.* 2007, 14, 1829–1852. [CrossRef]
- 19. Ivasiv, V.; Albertini, C.; Gonçalves, A.E.; Rossi, M.; Bolognesi, M.L. Molecular Hybridization as a Tool for Designing Multitarget Drug Candidates for Complex Diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2019**, *19*, 1694–1711. [CrossRef]
- 20. Singh, A.; Lumb, I.; Mehra, V.; Kumar, V. Ferrocene-appended pharmacophores: An exciting approach for modulating the biological potential of organic scaffolds. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 2840–2860. [CrossRef]
- Altowyan, M.S.; Ali, M.; Soliman, S.M.; Al-Majid, A.M.; Islam, M.S.; Yousuf, S.; Choudhary, M.I.; Ghabbour, H.A.; Barakat, A. Synthesis, computational studies and biological activity of oxamohydrazide derivatives bearing isatin and ferrocene scaffolds. J. Mol. Struct. 2019, 1202, 127372. [CrossRef]
- Guo, W.-Y.; Chen, L.-Z.; Shen, B.-N.; Liu, X.-H.; Tai, G.-P.; Li, Q.-S.; Gao, L.; Ruan, B.-F. Synthesis and in vitro and in vivo anti-inflammatory activity of novel 4-ferrocenylchroman-2-one derivatives. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2019, 34, 1678–1689. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Barišić, L.; Roščić, M.; Kovačević, M.; Semenčić, M.Č.; Horvat, Š.; Rapić, V. The first ferrocene analogues of muramyldipeptide. *Carbohydr. Res.* 2011, 346, 678–684. [CrossRef] [PubMed]
- Soares, M.B.P.; Costa, J.F.O.; de Sá, M.S.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Pigeon, P.; Jaouen, G.; Santana, A.E.G.; Goulart, M.O.F.; Hillard, E. Antiparasitic and immunomodulatory activities of 1,1-bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenyl-but-1-ene and its protected and free 2-ferrocenyl derivatives. *Drug Dev. Res.* 2010, *71*, 69–75. [CrossRef]
- 25. Chaudhary, A.; Poonia, K. The redox mechanism of ferrocene and its phytochemical and biochemical compounds in anticancer therapy: A mini review. *Inorg. Chem. Commun.* 2021, 134, 109044. [CrossRef]
- Shoukat, H.; Altaf, A.A.; Badshah, A. Ferrocene-Based Metallodrugs. In Advances in Metallodrugs: Preparation and Applications in Medicinal Chemistry; Ul-Islam, S., Hashmi, A.A., Khan, S.A., Eds.; Wiley-Scrivener: Beverly, CA, USA, 2020; pp. 115–136.
- Song, J.; Liu, H.; Lei, M.; Tan, H.; Chen, Z.; Antoshin, A.; Payne, G.F.; Qu, X.; Liu, C. Redox-Channeling Polydopamine-Ferrocene (PDA-Fc) Coating To Confer Context-Dependent and Photothermal Antimicrobial Activities. ACS Appl. Mater. Interfaces 2020, 12, 8915–8928. [CrossRef]
- 28. Larik, F.A.; Saeed, A.; Fattah, T.A.; Muqadar, U.; Channar, P.A. Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives. *Appl. Organometal. Chem.* **2016**, *31*, e3664. [CrossRef]

- dos Santos Filho, J.M.; Queiroz e Silva, D.M.A.; Macedo, T.S.; Teixeira, H.M.P.; Moreira, D.R.M.; Challal, S.; Wolfender, J.; Queiroz, E.F.; Soares, M.B.P. Conjugation of N-acylhydrazone and 1,2,4-oxadiazole leads to the identification of active antimalarial agents. Bioorg. Med. Chem. 2016, 24, 5693–5701. [CrossRef]
- 30. Mu, H.; Gong, R.; Ren, L.; Zhong, C.; Sun, Y.; Fu, E. An intramolecular charge transfer fluorescent probe: Synthesis and selective fluorescent sensing of Ag<sup>+</sup>. *Spectrochim. Acta Part A* **2008**, *70*, 923–928. [CrossRef]
- dos Santos Filho, J.M. Mild, Stereoselective, and Highly Efficient Synthesis of N-Acylhydrazones Mediated by CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O in a Broad Range of Solvents. *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 29, 6411–6417. [CrossRef]
- 32. Lopes, A.B.; Miguez, E.; Kümmerle, A.E.; Rumjanek, V.M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of *N*-acylhydrazone Derivatives. *Molecules* **2013**, *18*, 11683–11704. [CrossRef]
- da Silva, T.F.; Bispo Júnior, W.; Alexandre-Moreira, M.S.; Costa, F.N.; Monteiro, C.E.S.; Ferreira, F.F.; Barroso, R.C.R.; Noël, F.; Sudo, R.T.; Zapata-Sudo, G.; et al. Novel Orally Active Analgesic and Anti-Inflammatory Cyclohexyl-N-Acylhydrazone Derivatives. *Molecules* 2015, 20, 3067–3088. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Thota, S.; Rodrigues, D.A.; Pinheiro, P.S.M.; Lima, L.M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2797–2803. [CrossRef] [PubMed]
- Cordeiro, N.M.; Freitas, R.H.C.N.; Fraga, C.A.M.; Fernandes, P.D. Discovery of Novel Orally Active Tetrahydro-Naphthyl-N-Acylhydrazones with In Vivo Anti-TNF-α Effect and Remarkable Anti-Inflammatory Properties. *PLoS ONE* 2016, 11, e0156271. [CrossRef] [PubMed]
- Moraes, A.D.T.O.; Miranda, M.D.S.; Jacob, Í.T.T.; Amorim, C.A.D.C.; Moura, R.O.; Silva, S.Â.S.D.; Soares, M.B.P.; Almeida, S.M.V.; Souza, T.R.C.L.; Oliveira, J.F.; et al. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-*N*-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 5388–5396. [CrossRef] [PubMed]
- 37. Chellan, P.; Sadler, P.J. Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *Chem. Eur. J.* 2020, 26, 8676–8688. [CrossRef]
- Dos Santos Filho, J.M.; Moreira, D.R.; De Simone, C.A.; Ferreira, R.S.; McKerrow, J.H.; Meira, C.S.; Guimarães, E.T.; Soares, M.B.P. Optimization of anti-*Trypanosoma cruzi* oxadiazoles leads to identification of compounds with efficacy in infected mice. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 6423–6433. [CrossRef]
- Guzik, T.J.; Korbut, R.; Adamek-Guzik, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharm.* 2003, 54, 469–487.
- Parameswaran, N.; Patial, S. Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2010, 20, 87–103.
  [CrossRef]
- Lopez-Castejon, G.; Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011, 22, 189–195. [CrossRef]
- 42. Rollas, S.; Küçükgüzel, S.G. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* 2007, 12, 1910–1939. [CrossRef]
- Zeeshan, S.; Naveed, M.; Khan, A.; Atiq, A.; Arif, M.; Ahmed, M.N.; Kim, Y.S.; Khan, S. N-Pyrazoloyl and N-thiopheneacetyl hydrazone of isatin exhibited potent anti-inflammatory and anti-nociceptive properties through suppression of NF-κB, MAPK and oxidative stress signaling in animal models of inflammation. *Inflamm. Res.* 2019, 68, 613–632. [CrossRef] [PubMed]
- 44. Debnath, U.; Mukherjee, S.; Joardar, N.; Sinha Babu, S.P.; Jana, K.; Misra, A.K. Aryl quinolinyl hydrazone derivatives as anti-inflammatory agents that inhibit TLR4 activation in the macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *134*, 102–115. [CrossRef]
- Kohno, K.; Kataoka, J.; Ohtsuki, T.; Suemoto, Y.; Okamoto, I.; Usui, M.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 1997, 15, 1541–1550.
- Boyman, O.; Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, 17, 180–190. [CrossRef] [PubMed]
- Sheldrick, G.M. SHELXT—Integrated space-group and crystalstructure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* 2015, 71, 3–8. [CrossRef] [PubMed]
- Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem. 2015, 71, 3–8. [CrossRef] [PubMed]
- 49. Puschmann, H.; Bourhis, L.J.; Dolomanov, O.V.; Gildea, R.J.; Howard, J.A.K. OLEX2—A complete package for molecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 2011, 67, C593. [CrossRef]
- 50. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [CrossRef]