

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

LAISE ALINE MARTINS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS  
TIAZOLIDÍNICOS LPSF/GQ-2 E LPSF/RA-4 EM MODELO DE LESÃO  
PULMONAR AGUDA**

RECIFE  
2018

LAISE ALINE MARTINS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS  
TIAZOLIDÍNICOS LPSF/GQ-2 E LPSF/RA-4 EM MODELO DE LESÃO  
PULMONAR AGUDA**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e molecular aplicada ao estudo da ação de fármacos.

**Orientadora:** Dra. Christina Alves Peixoto

RECIFE

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

S237a Santos, Laise Aline Martins dos  
Avaliação do potencial anti-inflamatório dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4 em modelo de lesão pulmonar aguda / Laise Aline Martins dos Santos. Recife: [s.n.], 2018.  
92 p. : il., graf., tab. ; 29 cm.

Tese (Doutorado em Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz  
Orientadora: Christina Alves Peixoto

1. Lesão Pulmonar Aguda. 2. Tiazolidinedionas - agonistas. 3. Inflamação. 4. NF-kappa B - farmacologia. 5. MAPK Quinases/efeito dos fármacos. 6. PPAR gama - agonistas. 7. Avaliação pré-clínica de medicamentos. 8. Avaliação de drogas. I. Peixoto, Christina Alves. II. Título.

CDU 615

---

LAISE ALINE MARTINS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS  
TIAZOLIDÍNICOS LPSF/GQ-2 E LPSF/RA-4 EM MODELO DE LESÃO  
PULMONAR AGUDA**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e molecular aplicada ao estudo da ação de fármacos

Aprovada em: 21/03/2018

**BANCA EXAMINADOR**

---

Dra. Christina Alves Peixoto  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Dra. Valéria Pereira Hernandes  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Dra. Teresinha Gonçalves da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

---

Dra. Karla Patrícia de Sousa Barbosa Teixeira  
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

*À Deus por me conceder coragem para superar os obstáculos e me ensinar o caminho da persistência;*

*À minha querida mãe (Ivanise) e avó Clarice (in memoriam) por incentivar minha caminhada na vida e nos estudos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me deu forças para vencer as dificuldades e tornar tudo possível!

A orientação, empenho e dedicação da minha orientadora que será sempre uma inspiração para minha vida: Dra. Christina Peixoto, todas as suas contribuições foram fundamentais para o sucesso deste trabalho, sobretudo tornando a minha visão científica mais crítica, responsável e humana.

A minha família pequena em número, mas grande em ser especial: Minha mãe, Ivanise, por entender minhas ausências quando era preciso, dar palavras de incentivo nos momentos difíceis, enfim por estar ao meu lado sempre.

Ao apoio institucional da Fiocruz/IAM por dar suporte ao desenvolvimento deste estudo e proporcionar uma formação acadêmica de qualidade.

Agradeço a contribuição de todos os professores da Pós-graduação para o aperfeiçoamento da minha formação como cientista.

A toda equipe do Laboratório de Ultraestrutura, principalmente aqueles que me auxiliaram nas etapas críticas deste estudo: Karla Patrícia, Gabriel Rodrigues, Maria Eduarda, Wilma Oliveira, Sura Rocha e Denielle Los.

A Dra. Fernanda Mota colaboradora do departamento de antibióticos/UFPE, pela grande colaboração com o modelo animal.

Agradeço ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos por cederem as moléculas para este estudo, em especial a Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, Jamerson Oliveira e Maira Pitta.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica. Em especial, a Janice, pela dedicação, paciência e compromisso em orientar os estudantes.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia/IAM pela colaboração no compartilhamento do C-DiGit blot scanner.

Aos profissionais do Biotério de criação animal por estarem sempre disponíveis e dispostos ajudar durante os procedimentos.

A equipe de vigilância do IAM por garantir a minha segurança nos muitos finais de semana e períodos noturnos em que estive dedicada ao trabalho.

A toda a equipe da Unidade de Farmácia do Hospital das Clínicas/UFPE pelas palavras de incentivo para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos que iluminaram minha jornada tornando meu caminho mais leve: Fabia Soares, Renata Almeida, Lindinaura Barros, Heloísa Silva, Olga Freitas, Thaise Figueiredo, Aparecida Costa, Mônica, José Almir, Adulccio, Jaci, Gleicyvonne, Lúcia Barros... Enfim, a lista é imensa e todos estão em meu coração onde nunca vou esquecer de nenhum.

Agradeço a todos que contribuíram, torceram e incentivaram a realização deste trabalho, inclusive aos camundongos!

*Um dia, um menino empina a pipa e, orgulhoso aponta lá em cima, alto, distante e se impressiona. Mais tarde um homem chega nas nuvens, maravilhado, olha tudo do alto e sorri por recordar-se quão baixo sua pipa voava. Mas as nuvens ficaram lá embaixo, ele sobe e agora já não sabe onde estão as nuvens, as pipas e os meninos. Ele não pensa que ainda nem subiu, que, sobre o céu há o espaço, sobre o espaço o infinito e, depois, quem sabe? Não há grande conhecimento que não passe de uma pipa, de um olhar impressionado a partir de uma perspectiva menor e que se torna sábio quando reconhece que sequer chegou nas nuvens, que quanto mais alto pensa voar, mais perplexo ficará diante da própria relatividade. Somos todos meninos empinando pipas, impressionados, maravilhados, mas pouco atentos para o infinito que se estende sobre elas, pipas, apenas pedacinhos de papel coloridos presos em cordas se trombando no céu.*

*(Flávio Siqueira)*



SANTOS, Laise. Aline. Martins. **Avaliação do potencial anti-inflamatório dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-2 E LPSF/RA-4 em modelo de lesão pulmonar aguda.** 2018. 92f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

## RESUMO

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) constituem elevada causa de falência respiratória. Ainda não existe tratamento farmacológico capaz de reduzir os altos índices de mortalidade da LPA/SRDA. Os agonistas de PPAR $\gamma$ , dentre os quais compostos tiazolidínicos, também denominados Tiazolidinedionas (TZDs) surgem como alvos promissores por desempenharem importante papel no controle da resposta inflamatória. O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório de dois compostos TZDs: LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4 em modelo de LPA induzida por LPS. Camundongos da linhagem BALB/c foram divididos em cinco grupos: 1) Controle; 2) LPS intranasal (25 $\mu$ g); 3) LPSF/GQ-2 (30mg/kg) + LPS; 4) LPSF/RA-4 (20mg) + LPS e 5) Dexametasona (1mg/Kg) + LPS. O Lavado broncoalveolar (LBA) foi utilizado para avaliação dos níveis de Oxido Nítrico (NO) e contagem celular. O pulmão foi processado para histologia, Mieloperoxidase (MPO), Imunoistoquímica e western blot. A análise do LBA mostrou redução do infiltrado inflamatório nos grupos tratados com a LPSF/GQ-2, LPSF/RA-4 e DEXA quando comparados ao grupo LPS. Por sua vez, a análise do MPO tecidual demonstrou que o número de neutrófilos apresentou uma redução estatisticamente significativa nos grupos tratados com as Tiazolidinedionas testadas e DEXA. Comparativamente, o LPSF/GQ-2 obteve melhores resultados que o pré-tratamento com LPSF/RA-4 sobre a contagem de células, escore tecidual, níveis NO e expressão de IL-6. Além disso, apenas o LPSF/GQ-2 foi capaz de inibir significativamente a expressão de TNF $\alpha$ , iNOS e IL-1 $\beta$ . Avaliamos as vias do NF $\kappa$ B, MAPKs e PARP1 considerados importantes reguladores do processo inflamatório. Nesta análise, obtivemos, alto grau de inibição da fosforilação do I $\kappa$ B e NF $\kappa$ B pela LPSF/GQ-2. Em paralelo, a LPSF/GQ-2 foi capaz de reduzir a ativação da JNK, p38, considerados importantes reguladores da produção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O pré-tratamento com LPSF/RA-4 não foi eficaz em inibir a inflamação induzida pelo LPS, este efeito pode estar relacionado à ativação da ERK, que conduz a um perfil inflamatório por inativar o PPAR $\gamma$ , questões farmacocinéticas também podem estar envolvidas e precisam ser investigadas para um melhor detalhamento da LPSF/RA-4. Adicionalmente, a LPSF/GQ-02 reduziu significativamente a expressão de PARP1. Os dados obtidos nesse estudo indicam elevado potencial anti-inflamatório e protetor da LPSF/GQ-2 contra modificações teciduais, expressão de citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios da Lesão Aguda Pulmonar.

**Palavras chave:** Lesão Pulmonar Aguda. Inflamação. Tiazolidinedionas (TZDs). PPAR gama – agonistas. NF-kappa B. MAPK Quinases.

SANTOS, Laise. Aline. Martins. **Evaluation of the anti-inflammatory potential of thiazolidinediones LPSF/GQ-2 AND LPSF/RA-4 in acute lung inflammation model.** 2018. 92f. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

### ABSTRACT

Acute Lung Injury (ALI) or Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) are important causes of respiratory failure in critically ill patients. there is no effective pharmacologic therapy able to reduce the high mortality rates of ALI /ARDS. PPAR $\gamma$  agonists, chemically named thiazolidinedione compounds (TZDs) appear as promising targets for ALI/ARDS, due to its key role in inflammatory response control. The present study aims to evaluate the anti-inflammatory effect of two TZDs compounds: LPSF / GQ-2 and LPSF / RA-4 in LPS-induced ALI model. BALB/c mice were divided into five groups: 1) Control; 2) Intranasal LPS (25  $\mu$ g); 3) LPSF / GQ-2 (30mg / kg) + LPS; 4) LPSF / RA-4 (20mg) + LPS and 5) and DEXA (1mg / kg) + LPS. The bronchial- alveolar lavage (BALF) was removed to evaluate the levels of nitric oxide (NO) and cellular count. The lung is processed for histology, MPO, immunohistochemistry and western blot. The BALF analysis showed a reduction of inflammatory infiltrate in LPSF/GQ-2, LPSF/ RA-4, and DEXA groups. In parallel, the analysis of MPO tissue also showed lower numbers of PMNs in TZDs groups and DEXA. Comparatively, LPSF/GQ-2 obtained better results than LPSF/RA-4 about cell count, tissue score, NO levels and IL-6 expression. In addition, only LPSF/GQ-2 was able to inhibit the expression of TNF $\alpha$ , iNOS, and IL-1 $\beta$ , some results showed more inhibition than DEXA group. We also evaluated the NF $\kappa$ B, MAPKs and PARP protein expressions considered important regulators of inflammation. In this analysis, we obtained a reduction in all phosphorylated forms of NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, by LPSF/GQ-2. In parallel, LPSF/GQ-2 was also able to reduce the activation of JNK and p38, important regulators of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production. Pre-treatment with LPSF/RA-4 did not provide protection against LPS-induced inflammation, this response could be related to ERK activation, it is often associated with PPAR $\gamma$  inactivation and development of an inflammatory profile. Moreover, pharmacokinetic studies need be performed with LPSF/RA-4 to prove this oral bioavailability. In addition, the LPSF/GQ-02 reduced PARP expression. Our results indicated a great anti-inflammatory effect for LPSF/GQ-2 against the tissue alterations, proinflammatory cytokines, and proinflammatory transcription factors expressions present in ALI.

**Keywords:** Acute Lung Injury. Inflammation. Thiazolidinediones. PPAR gamma – agonists. NF-kappa B . Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases (MAPKs)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios clínicos da LPA/SDRA .....	23
Figura 2 - Rompimento da barreira alvéolo-capilar.....	23
Figura 3 – Principais mecanismos celulares da LPA induzida pelo LPS .....	27
Figura 4 - Mecanismos de ativação do NFkB mediada por quinases IKKs.....	29
Figura 5 - Principais vias de sinalização do LPS mediadas por TLR4. ....	31
Figura 6 - Ativação do PPAR gamma pela via clássica e alternativa.....	34
Figura 7 - Modelo de transrepressão do NFkB pelo PPAR $\gamma$ .....	35
Figura 8 - Estrutura química das novas Tiazolidinedionas (TZDs).....	40
Figura 9. Esquema experimental de indução da LPA .....	42
Figura 10 - Análise histológica dos pulmões 24hs após instilação nasal. ....	47
Figura 11 - Análise tecidual dos grupos pré-tratados.....	49
Figura 12 - Escore tecidual.....	50
Figura 13 - Avaliação da migração celular no LBA após instilação nasal .....	50
Figura 14. Avaliação dos níveis de MPO tecidual .....	51
Figura 15 - Quantificação indireta de NO pelos níveis de nitrato/nitrito .....	52
Figura 16 - Avaliação da imunomarcção e expressão de iNOS tecidual.....	53
Figura 17 - Avaliação da imunomarcção tecidual e expressão para IL-1 $\beta$ .....	54
Figura 18 - Avaliação da expressão tecidual de TNF $\alpha$ .....	55
Figura 19 - Avaliação da expressão tecidual para IL-6 .....	56
Figura 20 - Níveis relativos de expressão de I $\kappa$ B e NFkB fosforilados.....	57
Figura 21 – Níveis relativos de expressão das MAPKs fosforiladas .....	59
Figura 22 - Análise da Expressão de PARP1 .....	60

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 - Principais diferenças na classificação de SDRA/LPA.....</b>	<b>21</b>
<b>Quadro 2 - Estratégias farmacoterapêuticas empregadas na SDRA.....</b>	<b>33</b>
<b>Quadro 3 - Parâmetros analisados para obtenção do escore tecidual .....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína Ativadora 1
CBP	Proteína de ligação a CREB
CD95L	Ligante FAS Indutor de Morte Celular
COX	Ciclooxigenases
CXCR2	Receptor CXCR2 para quimiocinas
CXCL12	Quimiocina CXCL12
DAD	Dano alveolar difuso
ERK	Quinases Reguladas por Sinalização Extracelular
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GQ-2	5-(4-Cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
HGMB	Proteína Box de Alta Mobilidade
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IFN- $\beta$	Interferon beta
I $\kappa$ B $\alpha$	I-kappa-B-alpha
IKK	Complexo de quinases
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima Sintase de Óxido Nítrico Induzível
IRF3	Fator regulador de Interferon 3
IRAK-4	Receptor de IL-1 associado à quinase 4
LBA	Lavado Broncoalveolar
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
LTs	Leucotrienos
LT $\beta$ R	Linfotoxina- $\beta$
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MKK	MAPK-quinase
MKKK	MAPK quinase quinase
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAFLD	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
NFκB	Fator Nuclear kappa B
NLS	Sequência de Localização Nuclear
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
p38	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
PaO <sub>2</sub>	Pressão Parcial de oxigênio arterial
PARP	Poli(ADP-ribose)polimerase
p-ERK	Quinases Reguladas por Sinalização Extracelular fosforilada
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandinas
plkBα	I-kappa-B-alfa fosforilado
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMNs	Polimorfonucleares
pNFκB	Fator Nuclear kappa B fosforilado
p-p38	Proteínas quinases ativadas por mitógenos fosforilada
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos
PPREs	Elementos de Resposta a PPAR
RA-4	5,3-Benzil-5-(1H-Indol-3-Metileno)-Tiazolidina-2,4-diona
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SDMO	Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SIR	Síndrome Inflamatória Sistêmica
SRC1	Co-ativador 1 do receptor de esteroides
TABs	Proteína de ligação a TAK
TAK1	TGF β quinase ativada 1
TIR	Receptor para IL-1β
TLR	Receptores do tipoToll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	Receptor associado ao TNF
TrCP-SCF	Ubiquitina-proteína ligase
TRIF	Adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon-β.
TXA2	Tromboxano A2

TZDs	Tiazolidinedionas
VCAM	Molécula de Adesão Vascular
VCAM-1	Molécula de adesão celular -1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) - Histórico e definições</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Epidemiologia</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 Fisiopatologia da LPA/SDRA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3 O Modelo de Lesão Pulmonar Aguda induzida por LPS</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4 Mecanismos de ativação do NFκB pelo LPS</b> .....	<b>28</b>
2.4.1 Principais mecanismos de ativação do NFκB.....	28
2.4.2 Vias de sinalização ativadas pelos receptores tipo Toll (TLRS) pelo LPS .....	30
<b>2.5 Tratamentos comumente empregados na LPA/SDRA</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6 Potencial anti-inflamatório dos agonistas do PPARγ</b> .....	<b>33</b>
2.6.1 Desenvolvimento de novas TZDs com potencial anti-inflamatório .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Objetivo Geral:</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos:</b> .....	<b>39</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 Obtenção dos derivados tiazolidínicos</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2 Animais</b> .....	<b>40</b>
5.2.1 Desenho experimental:.....	41
<b>5.3 Eutanásia</b> .....	<b>42</b>
<b>5.4 Contagem de células do Lavado Broncoalveolar</b> .....	<b>42</b>
<b>5.5 Dosagem indireta dos níveis de óxido nítrico (NO)</b> .....	<b>43</b>
<b>5.6 Dosagem de MPO</b> .....	<b>43</b>
<b>5.7 Microscopia óptica e técnicas de coloração</b> .....	<b>44</b>
<b>5.8 Obtenção do escore tecidual</b> .....	<b>44</b>
<b>5.9 Imunoistoquímica (iNOS, IL-1β)</b> .....	<b>45</b>
<b>5.10 Western blot (IL-1β; IL-6; TNFα; IκBα, p-IκBα, NFκB, p-NFκB; p38 MAPK, p-p38MAPK; ERK, p-ERK, anti-PARP)</b> .....	<b>45</b>
<b>5.11 Análise Estatística</b> .....	<b>46</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>



6.1 Avaliação das alterações histológicas no modelo de LPA.....	47
6.2 Efeito protetor das novas TZDs e DEXA sobre as alterações histológicas .	48
6.3 Efeitos inibitórios das novas TZDs sobre a infiltração celular, níveis de MPO e NO .....	50
6.4 Efeitos inibitórios das novas TZDs sobre a expressão de iNOS e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) .....	52
6.5 Resposta sobre a avaliação da expressão dos níveis de NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B .....	56
6.6 Avaliação da expressão das MAPKs (ERK, JNK, p38) .....	58
6.7 Análise sobre a expressão de PARP 1 .....	58
7 DISCUSSÃO .....	61
8 CONCLUSÃO .....	66
REFERÊNCIAS.....	67
APENDICE A- Resumo gráfico .....	79
APENDICE B – Artigos publicados no doutorado (autoria principal).....	80
APENDICE C – Participação em trabalhos publicados (Co-autoria).....	83
APENDICE D - Aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEUA) .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e sua progressão denominada de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) constituem elevada causa de falência respiratória. Clinicamente, a LPA está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade sendo comparável ao número de mortes atribuídas ao câncer de mama (BERTHIAUME, 2005; RUBENFELD et al, 2005; SU et al.,2014).

A LPA pode ser causada por uma lesão direta (pneumonia, aspiração, inalação de toxinas) ou indireta (sepse, choque, pancreatite, pré-eclâmpsia) (JAIN; BELLIGAN. 2007). Estes processos, independentes de sua origem, induzem alterações importantes no parênquima pulmonar, tais como: edema, colapso alveolar e hipoxemia (TOMASHEFSKI, 2000; BAI; CHENG; WANG., 2010).

O Lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um importante causador de LPA (LI et al., 2013). Esta molécula, um glicolípido pertencente à membrana externa de bactérias gram-negativas, tem sido o agente mais amplamente utilizado em modelos experimentais de LPA e considerado um importante indutor de sepse (MULLER et al., 2002). Portanto, o LPS é capaz de reproduzir características-chaves da LPA, tais como: recrutamento leucocitário, produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular e edema (WORTHEN et al.,1987; MA et al., 2013). Em geral, o desafio com LPS provoca dano pulmonar vinte e quatro horas após desafio intranasal ou intratraqueal (SZARKA et al., 1997).

A inflamação é o mecanismo principal pelo qual o LPS induz a LPA (KIM et al., 2005). Em monócitos, a ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4) pelo LPS induz a ativação de diversas vias de sinalização de fatores transcricionais, tais como: Fator Nuclear Kappa B (NFκB) e Proteína Ativadora 1 (AP-1) (GUHA; MACKMAN, 2001). O controle sobre a expressão dos mediadores inflamatórios em resposta ao LPS é regulado principalmente pelo NFκB (IRIE et al., 2000).

A excessiva ativação da via do NFκB está implicada em várias doenças inflamatórias e no câncer. Desta forma, estudos apontam que a regulação do NFκB pode ser um potencial alvo terapêutico. Este fator regula a expressão de diversos componentes da resposta imune inata, tais como: citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (LI; VERMA, 2002).

Classicamente a ativação do NF $\kappa$ B depende da degradação do I $\kappa$ B após fosforilação por quinases I $\kappa$ B (IKKs). Ativadores de IKK compreendem proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPKs) que representam um ponto de convergência a numerosos estímulos, incluindo ligantes de receptores Toll-like (TRLs), IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ , e receptores de células T e B (YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

O mecanismo de ativação do processo inflamatório mediado pelo LPS tem como alvo diferentes tipos celulares, assim como fatores transcricionais. Nas células epiteliais, o LPS induz a ativação do NF $\kappa$ B considerado vital para o processo de resposta ao dano e inflamação tecidual provocada por estímulos locais ou sistêmicos. Além disso, estas células sob estímulo passam a expressar moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas as quais favorecem o recrutamento celular (CHENG; BAI; WANG, 2010) . Em paralelo, nos macrófagos alveolares ocorre intensa produção de mediadores inflamatórios, em especial o TNF $\alpha$  (CHENG; BAI; WANG, 2010).

O processo inflamatório desempenha papel crucial para o desenvolvimento da LPA, pois contribui para a disfunção das vias aéreas provocando o remodelamento tecidual que pode levar ao comprometimento definitivo do pulmão. A prevenção deste processo é o principal alvo de terapias eficientes (BECKER et al., 2006).

Nesse aspecto, novos agentes terapêuticos vêm sendo extensivamente estudados. Dessa forma, os agonistas do Receptor Ativador de Peroxissomos (PPAR) surgem como alvos promissores por desempenharem importante papel no controle da resposta inflamatória atuando sobre as células T, macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Em monócitos e macrófagos, os agonistas PPAR $\gamma$  inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (ZHANG; YOUNG, 2002; DELERIVE; FRUCHART; STAELS, 2001; PATEL et al, 2003).

Os PPARs são fatores de transcrição que pertencem à superfamília do receptor de hormônio nuclear, existem três subtipos chamados PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (ou PPAR $\delta$ ) e PPAR $\gamma$ . Estes fatores regulam a expressão de genes alvos pela ligação ao elemento responsivo do proliferador de peroxissomo específico (PPREs) nos sítios iniciadores dos genes regulados, codificados por três genes diferentes que compartilham uma proteína estrutural que é semelhante à estrutura de todos os membros da superfamília de receptor nuclear (DESVERGNE; WAHLI, 1999).

Um grupo de agonistas sintéticos de PPAR $\gamma$  compreende alguns fármacos prescritos para o tratamento do Diabetes, que tais como a Pioglitazona, pertencem

quimicamente à classe das tiazolidinedionas (TZDs). Novas TZDs têm sido extensivamente estudadas, sendo portadores de significativa atividade anti-inflamatória através de sua ação agonista PPAR (SANTOS et al., 2005; JANG et al., 2018; NAIM et al., 2017). A descoberta da ação imunomoduladora e anti-inflamatória dos PPAR $\gamma$  têm provocado investigações sobre seu potencial efeito como alvo para o tratamento de asma e outras doenças inflamatórias como Inflamação Pulmonar Aguda, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e Fibrose (SANDHU et al., 2012).

Recentemente, dois novos compostos tiazolidínicos LPSF/RA-4 e LPSF/GQ-2 apresentaram atividade anti-inflamatória significativa em modelos de Inflamação Aguda, Aterosclerose e Dano Hepático (BARBOSA et al., 2013; SOARES SILVA et al., 2013; SOARES SILVA et al., 2015). Porém, ainda é desconhecido o potencial terapêutico destes fármacos na LPA. Nessa perspectiva, este trabalho visa contribuir com a caracterização da ação anti-inflamatória de novos fármacos agonistas de PPAR $\gamma$  (LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4) como candidatos terapêuticos da LPA/SDRA.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) - Histórico e definições.

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foi primeiro reportada por Ashbough et al. (1967). Neste estudo, os autores descrevem a síndrome em doze pacientes, os quais apresentaram dispneia severa, taquipneia, hipoxemia refratária a oxigenoterapia, perda da complacência pulmonar e presença de infiltrados difusos na radiografia de tórax.

Em 1988, uma definição mais detalhada foi proposta baseada sobre parâmetros respiratórios, tais como: a fração da pressão arterial de oxigênio pela fração de oxigênio inspirado ( $PaO_2/FiO_2$ ), pressão positiva expiratória final (PEEP) complacência pulmonar e grau de infiltração observada na radiografia de tórax (MURRAY et al., 1988).

Em 1994, a Conferência de Consenso Americana- Europeia estabeleceu duas classificações baseadas na severidade dos sintomas que permitiu enquadrar os pacientes em dois grupos: Pacientes com menor grau de hipoxemia, diagnosticados com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e pacientes com maior grau de hipoxemia e diagnosticados com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (BERNARD et al., 1994).

De acordo com a Conferência de Consenso Americana-Europeia para definição de SDRA devem ser adotados três critérios: 1) Presença de hipoxemia severa, considerado quando a razão entre a Pressão Parcial de oxigênio arterial ( $PaO_2$ ) / fração inspirada de oxigênio ( $FiO_2$ ) for menor que 200mm Hg; 2) Presença de infiltrados bilaterais vistos na radiografia de Tórax; 3) Pressão de oclusão da artéria pulmonar < 18mmHg ou ausência de sinais clínicos ou ecocardiográficos de hipertensão atrial esquerda (BERNARD et al.,1994).

Um painel de especialistas estabeleceram novos critérios para SDRA, em 2012, internacionalmente conhecido como: A definição de Berlim. Nesta nova classificação foram recomendados três graus de severidade: leve, moderada e grave. Nessa classificação a LPA passou a ser uma subclassificação da SDRA, denominada grau leve. Além disso, a classificação de Berlim esclareceu algumas

lacunas deixadas pela definição anterior como o início dos sinais clínicos (RANIERI et al., 2012) (Quadro 1).

**Quadro 1 - Principais diferenças na classificação de SDRA/LPA**

<b>Definição de SDRA segundo a Conferência de Consenso Europeu Americana -1994</b>			
	<b>Início</b>	<b>Oxigenação</b>	<b>Alterações radiológicas</b>
<b>LPA</b>	Rápido	$\leq 300$ PEEP	Infiltrações bilaterais na radiografia de tórax
<b>SDRA</b>	Rápido	$\leq 200$ PEEP	
<b>Definição de SDRA segundo a definição de Berlim, 2012.</b>			
	<b>Início</b>	<b>Oxigenação</b>	<b>Alterações radiológicas</b>
<b>Leve</b>	Rápido <sup>a</sup>	$200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$	Opacidades bilaterais
<b>Moderada</b>	Rápido <sup>a</sup>	$100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$	
<b>Grave</b>	Rápido <sup>a</sup>	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$	
<b><sup>a</sup> – Até uma semana da condição clínica determinante ou piora dos sintomas respiratórios.</b>			

Fonte: Adaptado de BORDES et al. (2014).

A definição da LPA abrange os mesmos aspectos da SDRA, exceto pelo grau menos acentuado de hipoxemia presente na LPA ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ ). Desta forma, verifica-se que todos os pacientes com SDRA apresentam LPA, porém nem todo paciente com LPA evolui para SDRA. (AMATO et al., 2007).

## 2.2 Epidemiologia

A incidência e mortalidade da LPA/SDRA são pouco precisos decorrente das limitações dos critérios de diagnóstico e causa mortis. Em 2005, um estudo em Unidades de Terapia Intensiva nos Estados Unidos estimou a incidência de SDRA em torno de 58/100.000 habitantes com 141.500 novos casos por ano e taxa de mortalidade de 59.000 por ano (RUBENFELD et al., 2005).

Em 2016, dados de um estudo multicêntrico observacional em escala global conduzido em cinquenta países demonstraram que a SDRA continua representando um grave problema de saúde mundial, acometendo cerca de 10% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva, com índice de mortalidade em torno de 40% nos pacientes em estudo (LAFHEY et al., 2016).

### 2.3 Fisiopatologia da LPA/SDRA

A LPA/SDRA pode ser originada por uma lesão direta, tais como: pneumonia, infecções virais, infecções bacterianas, aspiração gástrica, trauma torácico ou inalação de toxinas. Assim como, a LPA/SDRA pode ser originada por causas indiretas, tais como: sepse, choque hipovolêmico, pancreatite e pré-eclâmpsia (BELLINGAN; JAIN, 2007).

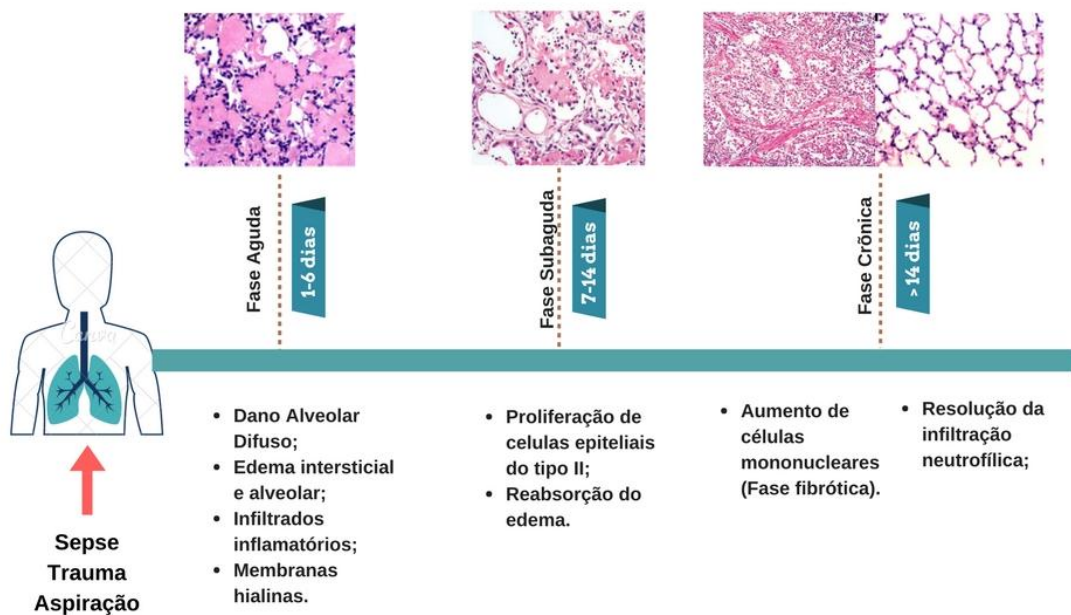
A LPA/SDRA é caracterizada por intenso processo inflamatório causador de Dano Alveolar Epitelial Difuso (DAD) e danos ao endotélio vascular do pulmão. A análise histológica na LPA/SDRA revela presença de DAD com infiltração neutrofílica, hemorragia alveolar e formação de membrana hialina (TOMASHEFSKI, 2000).

Bachofen e Weibel (1977) descreveram três estágios da LPA/SDRA: A fase aguda (1-6 dias) caracterizada por presença de edema intersticial e pulmonar, acúmulo de neutrófilos, macrófagos e hemácias nos alvéolos, assim como, presença de membranas hialinas. A fase subaguda (7-14 dias) em que ocorre a reabsorção de parte do edema seguida de intensa proliferação de células epiteliais do tipo II. Seguida pela fase crônica (acima de 14 dias) que se caracteriza por resolução da infiltração neutrofílica e aumento de células mononucleares. Em alguns casos, a resolução do dano alveolar difuso (DAD) é plena com apenas poucas alterações morfológicas, ou pode haver a progressão para um quadro fibrótico mais extenso (CHEUNG; GRAZIANO; SMITH, 2018) (Figura 1).

A fase aguda é seguida pela fase fibroproliferativa com alguns graus de fibrose, neovascularização e resolução tardia (GATTINONI et al., 1994). Entretanto estes estágios podem se sobrepor. O dano alveolar e o remodelamento tecidual podem ocasionar em hipertensão arterial pulmonar, a qual pode comprometer a função ventricular direita e exacerbar a hipoxemia (MURRAY et al., 1988; DUSHIANTHAN et al., 2011).

Segundo Matthay e Zemans (2011) a patogênese da LPA/SDRA pode ser melhor compreendida observando-se os mecanismos responsáveis pela formação do edema nos espaços alveolares e interstício pulmonar, assim como os mecanismos que bloqueiam a resolução do edema e remoção das células inflamatórias dos pulmões.

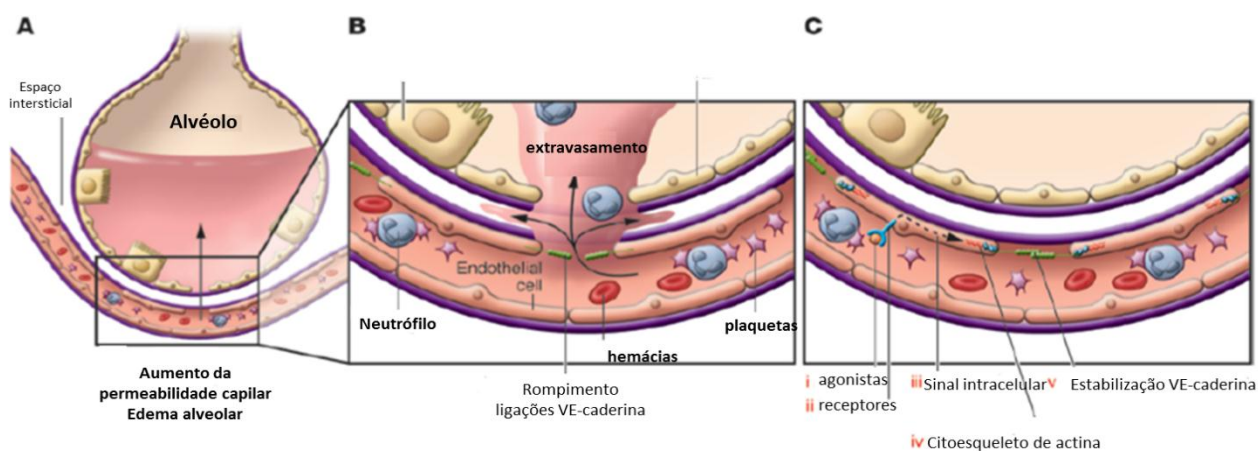
**Figura 1 - Estágios clínicos da LPA/SDRA**



Fonte: Elaborado pela autora a partir de Cheung; Graziano; Smith (2018); Matthay (2014).

O dano associado a vasculatura pulmonar é uma das causas mais importantes de LPA/SDRA (MATTHAY; ZEMANS, 2011). Durante a fase inicial da LPA/SDRA ocorre aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar e conseqüente aparecimento de fluido rico em proteínas nos espaços alveolares e edema (Figura 2).

**Figura 2 - Rompimento da barreira alvéolo-capilar.**



Fonte: Adaptado de Matthay, Ware e Zimmerman (2012, tradução nossa)



A barreira alvéolo-capilar é formada pelo epitélio alveolar e endotélio microvascular (WARE; MATTHAY, 2000). O capilar pulmonar apresenta endotélio seletivamente permeável, em que as proteínas permanecem no espaço intravascular, enquanto os fluidos atravessam as membranas, como resultado do balanço entre as forças hidrostáticas e gradientes oncóticos (GALHARDO; MARTINEZ, 2003).

Na LPA/SDRA o endotélio microvascular modificado aumenta a expressão de moléculas de adesão como Selectinas, Integrinas e membros da família de Imunoglobulinas (ICAM-1 – “intracellular adhesion molecule -1”), Molécula de Adesão Vascular (VCAM-1 – “vascular cell adhesion molecule -1”) que permitem o influxo de leucócitos para o tecido lesionados, principalmente neutrófilos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O acúmulo de neutrófilos na microvasculatura pulmonar provoca intenso dano a membrana endotelial provocando a perda da função da barreira endotelial (MATTHAY; ZEMANS, 2011). Em muitos modelos experimentais, os neutrófilos constituem uma etapa crítica de dano (FOLKESSON et al., 1995; WEISER et al., 1997; LOONEY et al., 2006). Os neutrófilos são o tipo celular predominante na LPA/SDRA, estes ao serem ativados modificam a estrutura dos microtúbulos tornando-se mais rígidos e menos deformados. Além disso, os neutrófilos ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  – “tumoral necrosis fator”), Interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”) que contribuem para a destruição da arquitetura dos alvéolos característica nos pacientes com SDRA e LPA (GOODMAN et al., 2003; JAIN; BELLINGAN, 2007).

Em condições patológicas os neutrófilos ativados podem danificar o epitélio alveolar por liberação de moléculas intracelulares tóxicas, as quais induzem a quebra das zonas de oclusão intracelulares e induzem a apoptose ou necrose nas células epiteliais do tipo I e II (MATTHAY; ZEMANS, 2011).

O dano às células epiteliais do tipo I contribuem para formação do edema pulmonar por rompimento da barreira epitelial que expõe a membrana basal predispondo a bacteremia e sepse (DUSHIANTHAN et al., 2011). Em paralelo, o dano à célula epitelial tipo II bloqueia a produção de surfactante pulmonar resultando em aumento da tensão superficial pulmonar e colapso alveolar (WARE; MATTHAY, 2000).

A patologia da LPA/SDRA é complexa nos insultos sistêmicos, tais como a sepse. Nestes quadros, a inflamação extrapulmonar é severa em reflexo da Síndrome Inflamatória Sistêmica (SIR) e Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (SDMO) ou falência Múltipla de Órgãos (BAUE; DURHAM; FAIST, 1998; KARIMA et al., 1999).

### **2.3 O Modelo de Lesão Pulmonar Aguda induzida por LPS**

Os Modelos animais permitem explorar mecanismos patológicos de doenças humanas, identificar marcadores de diagnóstico, terapias e prognósticos, assim como descobrir novos alvos terapêuticos para desenvolvimento de fármacos (CHEN; BAI; WANG. 2010). Além disso, permitem que hipóteses geradas em estudos humanos e *in vitro* possam ser testadas (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Admite-se que modelos animais ideais são capazes de reproduzir os mecanismos e consequências das doenças humanas incluindo as características fisiológicas e patológicas. Nesse aspecto, o modelo experimental de dano induzido por LPS é considerado bastante útil por assemelhar-se à LPA/SDRA em humanos (CHEN; BAI; WANG. 2010).

O Lipolissacarídeo (LPS) é um dos principais constituintes da parede celular de bactérias Gram-negativas. A exposição ao LPS em animais e humanos provoca as principais características do dano pulmonar microvascular, dentre as quais: a formação do edema pulmonar, a inflamação severa e infiltração celular (MIRZAPOIAZOVA et al., 2007).

O modelo de inflamação aguda pulmonar induzido pelo LPS reproduz o dano à barreira epitelial e endotelial nos pulmões, assim como a resposta inflamatória nos espaços alveolares. Esta resposta pode ser observada empregando-se a via inalatória ou sistêmica (intraperitoneal/intravenosa) utilizando um curto intervalo de tempo em geral não maior que quarenta e oito horas (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Em geral, o LPS provoca as principais características de dano pulmonar em camundongos após vinte e quatro horas da administração intranasal ou intratraqueal. Estas vias são mais empregadas no modelo de LPA/SDRA, pois a administração intravenosa e intraperitoneal não induz uma resposta tecido-específica ou similar grau de dano pulmonar (SZARKA et al., 1997; VAN HELDEN et al., 1997).

A suscetibilidade para o desenvolvimento de LPA frente ao desafio intratraqueal/intranasal de LPS pode ser variável devido a backgrounds genéticos entre as linhagens. Essa diferença se reflete sobre a produção de mediadores inflamatórios, duração da inflamação e outros aspectos. As linhagens de camundongo BALB/c e C57Bl/6 são exemplos dessa variação (ALM et al., 2010).

Matute-Bello et al. (2008) numa revisão sistemática relataram que camundongos BALB/c são mais susceptíveis ao LPS, enquanto que os da linhagem C57Bl/6 são considerados mais resistentes. Diferenças de gênero constituem outro importante fator para a escolha do animal no estudo experimental, os animais machos são considerados mais susceptíveis, enquanto as fêmeas possuem vantagens de sobrevivência maior (ZELLWEGER et al., 1997). Fatores relacionados à resposta imune e hormonais podem estar associados a este fenômeno (FOWLER et al., 2009).

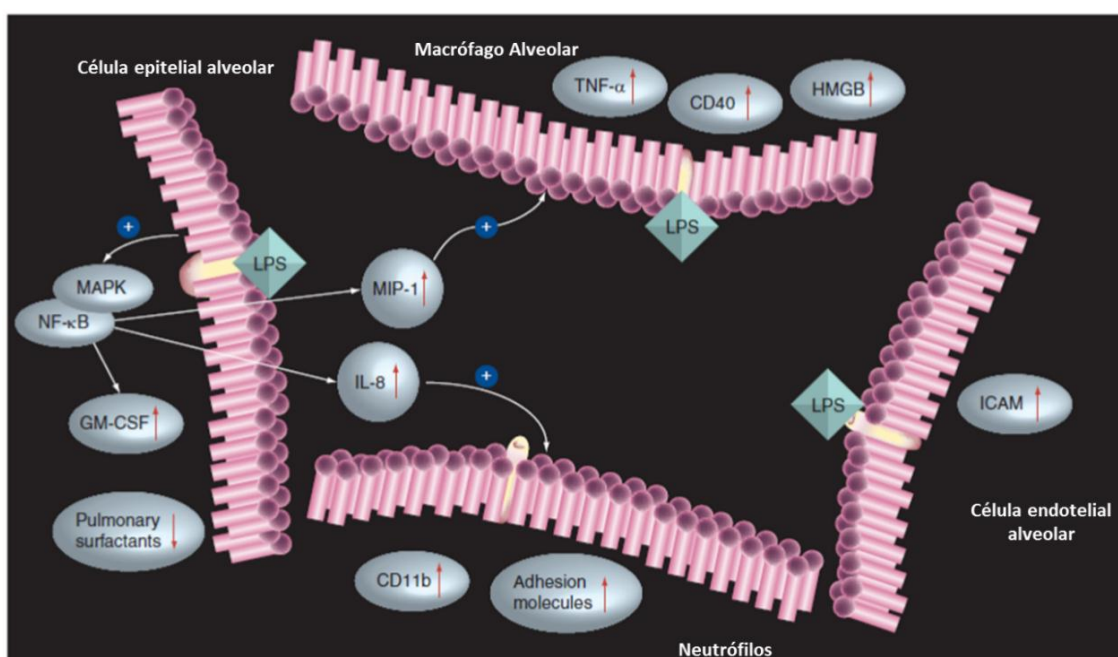
O LPS liga-se aos receptores do tipo Toll (TRL: Toll-like receptors) sobre o epitélio pulmonar induzindo aumento da expressão de citocinas e quimiocinas. O aumento sobre a expressão gênica sobre TLR-2 e TLR-4 após a exposição ao LPS está intimamente relacionado com o início da LPA (OSHIKAWA; SUGIYAMA, 2003; CHEN; BAI; WANG, 2010). O LPS induz aumento da expressão de TLR-2 via ativação do NFκB, que responde pela ativação da resposta imune inata contra patógenos no pulmão (OSHIKAWA; SUGIYAMA, 2003).

A migração e ativação dos neutrófilos são uma etapa crucial para amplificar a resposta inflamatória na LPA (UCHIBA et al., 1995). O LPS induz alteração na produção de mediadores, tais como CXCL12, receptor de quimiocinas-2 (REUTERSHAN et al., 2006) e fatores derivados de neutrófilos (MIOTLA et al., 1996). A migração transendotelial de neutrófilos inicia-se rapidamente após a exposição ao LPS com aumento da expressão de moléculas de adesão sobre os neutrófilos circulantes (ZHAO et al., 2005), aumentando continuamente até o alcance de um platô (REUTERSHAN et al., 2005). No estágio tardio da LPA, o LPS aumenta a expressão de CXCL12 sobre o epitélio pulmonar e CXCR4 sobre os neutrófilos indicando que o CXCL12 promove a transição da resposta inflamatória para o início da fase de reparo tecidual (PETTY et al., 2007).

As células epiteliais alveolares possuem um papel central no desenvolvimento da LPA, sendo também ativadas pelo LPS (WANG et al., 2007). Em resposta ao dano, as células epiteliais também expressam e secretam moléculas de adesão,

citocinas e quimiocinas que estimulam o recrutamento de células efetoras, tais como: macrófagos e neutrófilos (CHEN; BAI; WANG, 2010). Os macrófagos alveolares também participam do processo inflamatório através da indução da resposta oxidativa e remoção de células apoptóticas (BRIELAND; KUNKEL; FANTONE et al., 1987; CHEN; BAI; WANG, 2010). O aumento da expressão de CD40 nos macrófagos induz a superprodução de mediadores inflamatórios como o TNF $\alpha$ , aumentando a expressão do fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e estimulando a proliferação celular que podem contribuir para reparação dos alvéolos (CAKAROVA et al., 2009), conforme esquematizado na Figura 3.

**Figura 3 – Principais mecanismos celulares da LPA induzida pelo LPS.**



Fonte: Adaptado de: Chen; Bai; Wang (2010).

Notas: A LPA induzida pelo LPS tem como primeiro alvo a célula epitelial alveolar com subsequente ativação da MAPK e NF $\kappa$ B que resultam no aumento da produção de citocinas inflamatórias e moléculas bioativas, tais como: GM-CSF, MIP-1 e IL-8. Nos pneumócitos tipo II a síntese de surfactantes é inibida. Enquanto, nos macrófagos alveolares ocorre aumento da expressão de HMGB e redução da fagocitose. Nas células endoteliais a expressão de moléculas de adesão estimula a entrada de neutrófilos resultando em dano endotelial.

Além disso, o LPS favorece ao aumento da expressão de proteínas box de alta mobilidade (HMGB- “High Mobility Group Box protein”) em macrófagos, resultando em bloqueio da esferocitose e aumento da resposta inflamatória (LIU et al., 2008; FENG et al., 2008). Nas células endoteliais, o LPS ativa a expressão de

CXCR2, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular (ZARBOCK et al., 2009).

## **2.4 Mecanismos de ativação do NFκB pelo LPS**

A ativação da via do NFκB configura-se num importante passo na fisiopatologia na Inflamação aguda pulmonar e SDRA (MOINE et al., 2000). Em pacientes diagnosticados com SDRA a ativação excessiva da via do NFκB contribui para a progressão do estímulo inflamatório. Segundo Nys et al. (2003) o nível de ativação do NFκB está fortemente correlacionado com a progressão da disfunção pulmonar, constituindo-se num possível marcador para a severidade da disfunção respiratória.

### **2.4.1 Principais mecanismos de ativação do NFκB**

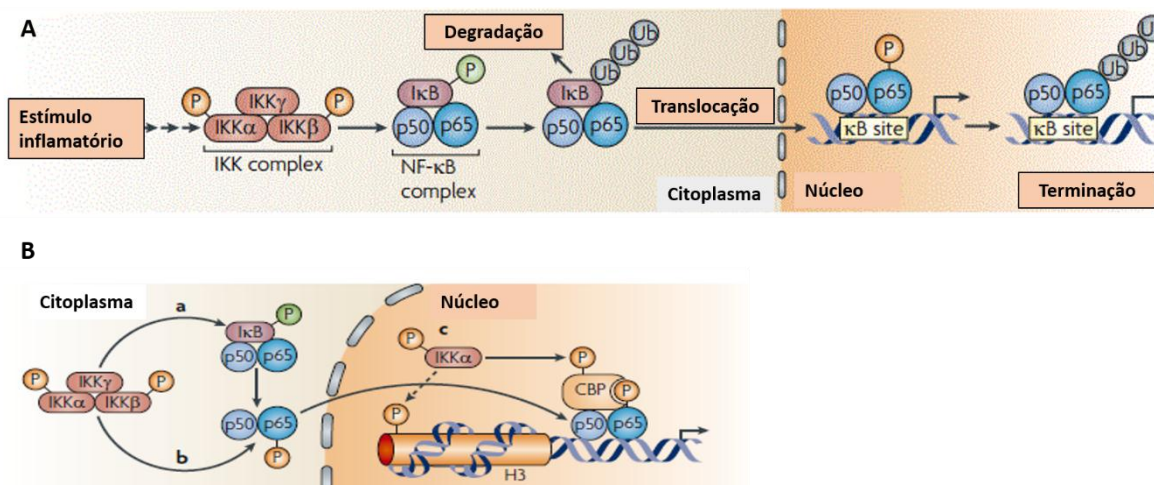
O fator nuclear NFκB é considerado vital para ativação da inflamação em resposta ao estímulo local e sistêmico (CHENG et al., 2007). A família de fatores nucleares – kappa B englobam fatores transcricionais diméricos que possuem a homologia Rel (RHD) que se ligam a sequências do DNA denominadas regiões κB (5'-GGGRNNYYCC-30; R, purina; Y, pirimidina; N, outro nucleotídeo). Os fatores de transcrição NFκB ligam-se nas regiões kappa B de promotores e “enhancers” numa variedade de genes, os quais induzem ou reprimem a transcrição (GILMORE, 2006).

Em mamíferos, existem cinco membros da família NFκB: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NFκB1- precursor da p50) e p100 (NFκB2 – precursor da p52) (KAWAI; AKIRA, 2007). As proteínas do NFκB formam homo/heterodímeros e regulam a expressão de componentes do sistema imune inato e específico, tais como: citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas induzíveis (iNOS, COX-2), proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e moléculas co-estimulatórias (LI; VERMA, 2002; MOYNAGH, 2005).

Em condições basais, os dímeros NFκB estão associados a proteínas IκB inibitórias (IκBα, IκBβ e IκBε) que mantêm os complexos aprisionados no citoplasma por mascarar suas sequências de localização nuclear (NLS - “nuclear localization sequences”) (MOYNAGH, 2005; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011).

Após um estímulo inflamatório as proteínas I $\kappa$ B são degradadas à medida que são fosforiladas por quinases do complexo IKK. Basicamente este complexo é constituído por duas enzimas catalíticas (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) e uma subunidade regulatória IKK $\gamma$  (NEMO). As proteínas I $\kappa$ B fosforiladas ligam-se ao complexo ubiquitina-proteína ligase  $\beta$ -TrCP-SCF que promove a poliubiquitinação do I $\kappa$ B e direciona sua degradação aos proteossomos 26S. Este evento ocasiona na liberação dos dímeros de NF $\kappa$ B para o núcleo (MOYNAGH, 2005).

**Figura 4 - Mecanismos de ativação do NF $\kappa$ B mediada por quinases IKKs.**



Fonte: Adaptado de Ghosh; Hayden (2008, tradução nossa)

Legendas: A) mecanismo de ativação da via do NF $\kappa$ B pela via clássica. B) Mecanismo de fosforilação do NF $\kappa$ B (p65) via complexo de IKKs no citoplasma (a,b) e núcleo (c) promovendo fosforilação da histona H3, aumento da acessibilidade da região  $\kappa$ B. Nota: a fosforilação das IKKs podem também ter associação a repressão da transcrição em casos específicos.

Existem duas vias de ativação do NF $\kappa$ B denominada via clássica e não-clássica. A primeira é dependente de IKK $\beta$  e NEMO conduzindo a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  e translocação nuclear de heterodímeros p65 (Figura 4, A). A via não-clássica depende da fosforilação de p100-RelB mediada pela IKK $\alpha$ , resultando na geração de complexos p52-RelB. A via não-clássica é induzida por membros específicos da família do TNF, tais como o ligante CD40, o receptor de linfotóxina- $\beta$  (LT $\beta$ R) e o receptor do fator ativador de célula B (BAFF), principalmente implicados no desenvolvimento da célula B e organogênese dos linfócitos (MOYNAGH, 2005; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011).

A atividade transcricional do NFκB pode ser regulada por mecanismos independentes da degradação do IκB. Alguns estudos têm demonstrado que a ligação ao DNA e a capacidade de transativação do NFκB é aumentada pela fosforilação da p65. Neste contexto, proteínas quinases, tais como: IKKs, proteína quinase A (PKA), proteína quinase ativada por mitógenos (p38 MAPK), proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína quinase C (PKC) têm demonstrado fosforilar a p65 e conseqüentemente aumentar a sua capacidade transcricional (CHEN; LIN., 2001; VANDEN BERGHE et al., 1998) (Figura 4, B).

#### 2.4.2. Vias de sinalização ativadas pelos receptores tipo Toll (TLRS) pelo LPS

O LPS em pequenas quantidades é capaz de ativar as células do sistema imune inato via TLR4 levando à produção de mediadores pró-inflamatórios, tais quais: TNFα, IL-1β, IL-6 (WEST; KOBLANSKY; GOSH, 2006; LIEN et al., 2000).

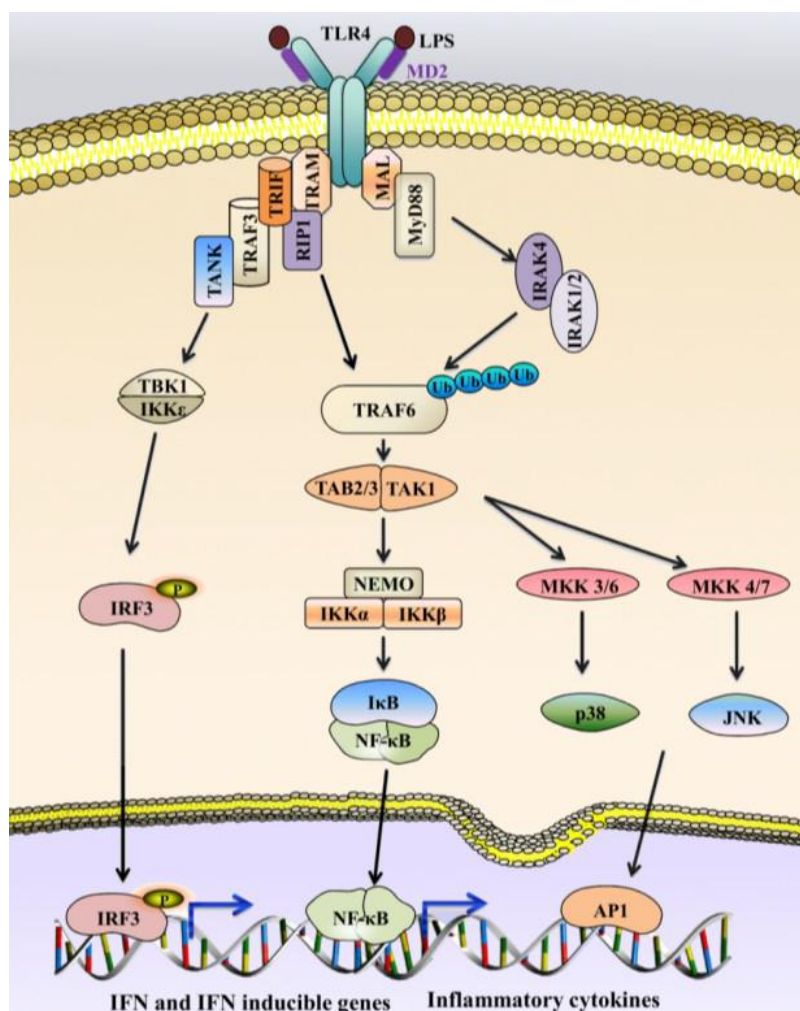
Os receptores TLRs (Toll-like receptors) atuam como sensores primários para a entrada de patógenos. Todos os TLRs convergem para a ativação do NFκB (KAWAI; AKIRA, 2007). O LPS liga-se ao TLR4 para ativação da resposta inflamatória. Os TLRs recrutam um conjunto de proteínas adaptadoras com receptores TIR através de interações homofílicas que disparam as cascatas de sinalização que ativam o NFκB (KAWAI; AKIRA, 2007).

A ligação do LPS ao seu receptor TLR4 (toll like-4) ativa duas principais vias de sinalização que se distinguem pela dependência de moléculas adaptadoras do fator de diferenciação mielóide (MyD88) ou adaptadores de domínio TIR que induz IFN-β (TRIF). Ambas as vias resultam em ativação do NFκB (Figura 5) (KAWAI; AKIRA, 2007). A via de sinalização dependente de MyD88 é iniciada através de uma mudança conformacional no domínio citoplasmático TLR, o qual leva a associação de MyD88 com o TLR entre seus domínios TIR. Subseqüentemente, ocorre a sinalização entre MyD88 com os domínios de morte do receptor associado à quinase 4 (IRAK-4). A ligação de IRAK-4 a MyD88 ativa a fosforilação de IRAK-1, que por sua vez sofre auto fosforilação e recruta a TRAF6 para o complexo MyD88/IRAK/IRAK1. Em seguida, IRAK-1 e TRAF6 dissociam-se do complexo receptor e interagem com moléculas adicionais resultando em ativação da JNK e IKKs. Estas proteínas induzem a AP-1 (Proteína Ativadora 1) e a ativação do NFκB (KAWAI; AKIRA, 2007).

A via de sinalização MyD88 independente/ TRIF dependente resulta em ativação de IRF3, considerado um fator chave para a produção de IFN- $\beta$  e ativação tardia de NF $\kappa$ B via TLR4 (KAWAI et al., 2001).

Na via de ativação do NF $\kappa$ B mediada por MyD88, a ativação da TRAF6 envolve o recrutamento de um complexo de quinases envolvendo a TAK1 e TABs, as quais compreendem duas vias distintas de sinalização associadas ao complexo de IKK e quinases MAPK (ERK, JNK, p38) em que a TAK1 fosforila a quinase IKK $\beta$  (WANG et al., 2001) (Figura 5).

**Figura 5 - Principais vias de sinalização do LPS mediadas por TLR4.**



Fonte: Anwar e Choi (2014).

Nota: A sinalização do LPS via TLR4, ativa as vias MyD88 independente/TRIF dependente. A via dependente de MyD88 é responsável pela fase inicial de ativação de NF $\kappa$ B e MAPK, os quais induzem citocinas pró-inflamatórias. A via dependente de TRIF ativa IRF3, responde pela indução de IFN- $\beta$ .



Os ativadores do complexo de IKKs incluem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), tais como: MEKK1, MEKK3 e TAK1, as quais representam um ponto de convergência a numerosos estímulos, incluindo ligantes do receptor Toll-like (TLR), IL-1 $\beta$ , receptores da superfamília do TNF e receptores de células B e T (MOYNAGH, 2005). As proteínas mitógeno ativadas (MAPKs) regulam a ativação da via do NF $\kappa$ B pelo LPS através da fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  e NF $\kappa$ B durante a LPA (KIM et al., 2006).

As MAPKs são membros de um sistema de três quinases constituídas pela MAPK, MAPK-quinase (MKK) e MAPK quinase quinase (MKKK). Esta última fosforila e ativa as MKKs, que por sua vez

fosforila e ativa a MAPKs. ERK e MAP quinases são ativadas por MKK1 e MKK2. Enquanto quinases p38 MAPK são ativadas por MKK3, MKK6. As quinases JNKs são ativadas por MKK4 e MKK7 (HITTI; KOTLYAROV, 2007).

## **2.5 Tratamentos comumente empregados na LPA/SDRA**

As terapias farmacológicas atualmente empregadas na LPA/SDRA tem como objetivo principal o controle da inflamação, oxigenação e perfusão tecidual (SWEENEY; GRIFFITHS; MCAULEY, 2013). Apesar dos inúmeros estudos clínicos realizados, ainda não existe farmacoterapia eficaz que impacte na redução dos níveis de mortalidade da SDRA (JOHNSON; MATTHAY, 2010). O quadro 2 mostra um resumo das principais estratégias utilizadas no tratamento da LPA/SDRA.

Em relação ao emprego de corticosteroides para o controle do processo inflamatório na LPA/SDRA existem controvérsias. Apesar de alguns estudos demonstrarem significativa melhora nos pacientes em uso de metilprednisona (MEDURI et al., 2016), outros autores relatam significativa falha nos estudos clínicos randomizados que comprometem a qualidade da evidência (BLOT et al., 2017; RUAN et al., 2014).

Dessa forma, há uma intensa procura por novas terapias farmacológicas efetivas. Neste campo estratégias estão sendo empregadas para o controle do processo inflamatório utilizando outras classes de medicamentos, tais como: antioxidantes, antiproteases, antibióticos, surfactantes e terapia celular (SWEENEY; GRIFFITHS; MCAULEY, 2013).

**Quadro 2 - Estratégias farmacoterapêuticas empregadas na SDRA**

<b>Terapias comumente utilizadas na LPA/SDRA</b>	<b>Potenciais terapias em investigação</b>
<b>Alvo : Inflamação</b>	<b>Alvo: Inflamação</b>
<i>Corticosteroides</i>	<i>Estatinas</i>
<i>Farmaconutrientes</i>	<i>Insulina</i>
<i>Antioxidantes</i>	<i>Macrolídeos</i>
<i>Antiproteases</i>	<i>Inibidores de Metaloproteinases</i>
<i>Cetoconazol</i>	<i>Inibidores do complemento</i>
<b>Alvo: suporte a ventilação</b>	<i>Interferon Beta recombinante</i>
<i>Bloqueadores neuromusculares</i>	<i>Anti-IL-8</i>
<i>Agonistas <math>\beta 2</math></i>	<i>Anti-CD14</i>
<i>Surfactantes</i>	<i>Aspirina</i>
<b>Alvo: edema</b>	<i>Vitamina D</i>
<i>Diuréticos</i>	<i>Inibidor da p38 MAPK</i>
<i>Agonistas <math>\beta 2</math></i>	
<b>Alvo: perfusão tecidual</b>	<b>Alvo: perfusão tecidual</b>
<i>Vasodilatadores</i>	<i>Vasoconstritores</i>
<i>Antiplaquetários</i>	<i>Anticoagulantes</i>
	<i>Fibrinolíticos</i>
	<b>Alvo: terapia celular</b>
	<i>Células tronco</i>
	<i>Reprogramação celular</i>
	<i>Fatores de crescimento</i>

Fonte: Adaptado de Sweeney; Griffiths; Mcauley (2013)

## 2.6. Potencial anti-inflamatório dos agonistas do PPAR $\gamma$

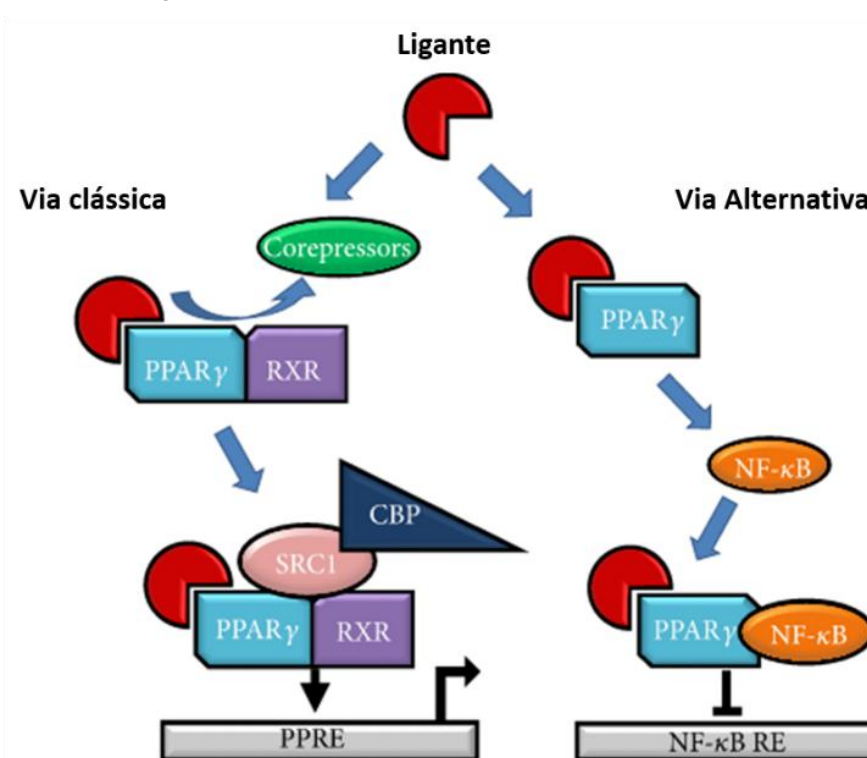
Os PPARs (Receptores nucleares de peroxissomos ativados) constituem-se numa família de receptores hormonais nucleares que possuem três isoformas: PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$  (PADILA et al, 2002; AKBIVIK et al., 2004; ASAKA et al., 2004). O PPAR $\gamma$  possui uma variedade de funções biológicas, tais como: a síntese e regulação de ácidos graxos, glicose, adipogênese e inibição da inflamação através do NF $\kappa$ B (CROASHDELL et al., 2015).

O PPAR $\gamma$  é expresso em várias células do sistema imune. Em geral, encontra-se como um heterodímero complexado com o receptor do ácido retinóico (RXR $\alpha$ ) associadas a moléculas co-repressoras. Após o estímulo do receptor pelo ligante, as moléculas co-repressoras são dissociadas e co-ativadores (CBP e SRC1) formam um complexo ativado ligando-se a elementos de resposta ao PPAR $\gamma$

(PPRE), correspondente a via clássica de ativação (CROASDELL et al., 2015), conforme exemplificado pela Figura 6.

Alternativamente, estudos demonstram que agonistas de PPAR $\gamma$  podem auxiliar na formação complexos com o NF $\kappa$ B e AP-1, favorecendo a repressão dos genes alvos por um mecanismo de transrepressão (Figura 7) (DELERIVE et al., 1999; RIZZO; FIORUCCI, 2006; CROASDELL et al., 2015;) . Além disso, estudos mostram que PPAR $\gamma$  pode modular a ativação da p38 MAPK e promover repressão gênica da iNOS (RIZZO; FIORUCCI, 2006).

**Figura 6 - Ativação do PPAR gamma pela via clássica e alternativa.**



Fonte: Adaptado de CROASHDELL et al. (2015).

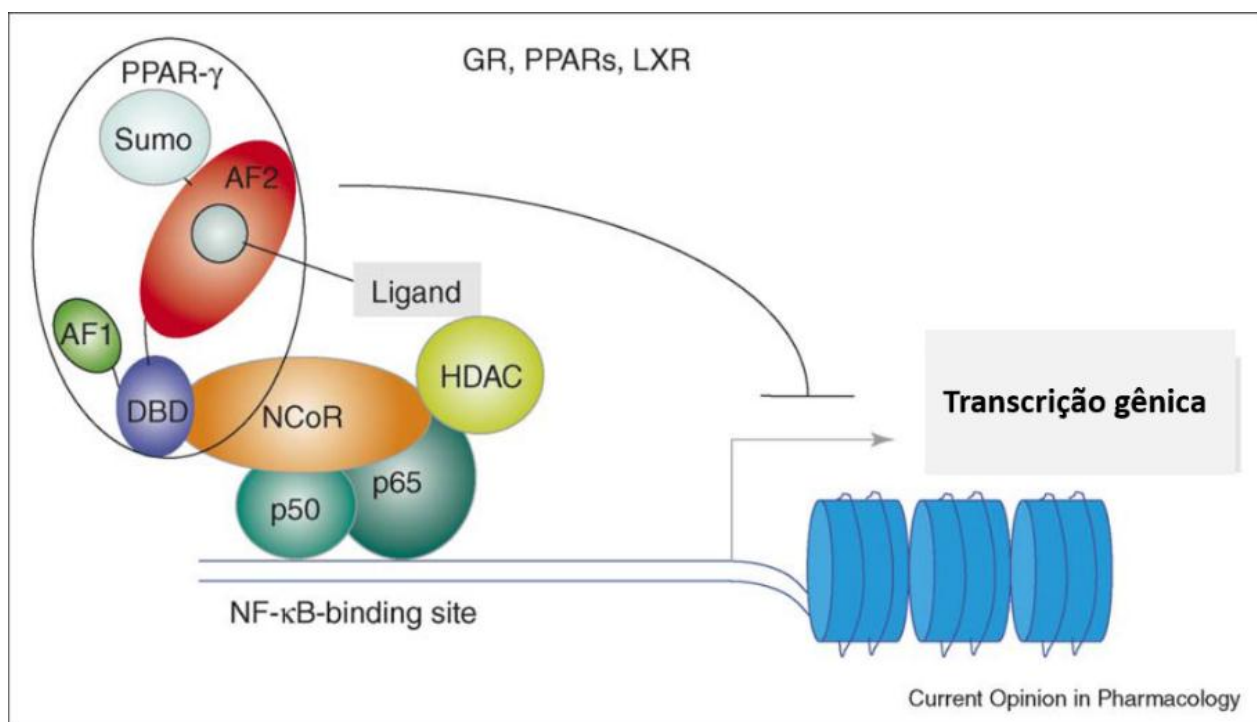
Legendas: Via clássica (esquerda) e Via Alternativa (direita). Normalmente, PPAR $\gamma$  existe como um heterodímero acoplado a RXR $\alpha$  e moléculas co-repressoras, após a ligação com o agonista, ocorre a dissociação dos co-repressores e recrutamento de co-ativadores, tais como: CBP e SRC1 que formam um complexo ativado ligado ao elemento de resposta ao PPAR $\gamma$  (PPRE). Alternativamente, após a ligação ao agonista o PPAR $\gamma$  pode ligar-se ao NF $\kappa$ B e reprimir genes alvos ativados pelo NF $\kappa$ B.

A estimulação do PPAR $\gamma$  tem sido associado a potente efeito anti-inflamatório (CROASDELL et al., 2015; KULKARNI et al., 2012). Particularmente, a ligação com o PPAR $\gamma$  atua sobre o sistema imune inato principalmente em monócitos e macrófagos (REDDY et al., 2008). Além disso, a expressão de citocinas pró-

inflamatórias torna-se afetada (CROASDELL et al., 2015). O TNF $\alpha$  tem sua expressão reduzida após a administração de Tiazolidinedionas (TZDs), sendo este efeito abolido com a administração de um antagonista, Diglicil éter de bisfenol A (DGEBA) (CUZZOCREA et al., 2003; ZHANG et al., 2010).

A expressão de IL-6 também foi significativamente afetada com o uso de TZDs em modelos de inflamação aguda (ZINGARELLI et al., 2003; CELINSKI et al., 2011; GAO et al., 2015).

**Figura 7 - Modelo de transrepressão do NF $\kappa$ B pelo PPAR $\gamma$ .**



Fonte: Rizzo; Fiorucci (2006).

Nota: Em condições basais, complexos contendo NCoR e a histona acetiltransferase (HDAC) estão associadas a um conjunto de promotores da resposta inflamatória. Na presença do ligante o PPAR $\gamma$  sofre sumoilação alcançando o complexo NCoR evitando sua ubiquitinação. Em consequência, o complexo co-repressor NCoR permanece acoplado impedindo a transcrição de genes dependentes do NF $\kappa$ B.

Adicionalmente, a ativação do PPAR $\gamma$  está associada a redução do influxo de neutrófilos (CROASDELL et al., 2015). Outros estudos comprovam que ligantes do PPAR $\gamma$  foram capazes de estimular a fagocitose pelos macrófagos e aumentar a promoção de macrófagos M2 (BOUHLEL et al., 2009; PENAS et al., 2015) processo considerado crítico para o processo de reparo e regeneração tecidual (CROASDELL et al., 2015).

Existem diversos ligantes do PPAR $\gamma$  identificados que incluem: Tiazolidinadionas (TZDs), prostaglandinas (PGD), ácido oleico e eicosanoides (KULKARNI et al., 2012). Alguns efeitos indesejados das TZDs comercialmente disponíveis limitaram seu uso na prática clínica, sendo alguns retirados do mercado em razão dos efeitos cardiovasculares e hepatotóxicos apresentados (Rosiglitazona, Troglitazona), porém diversos estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver TZDs mais seguras e eficazes (WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016; JANG et al., 2018).

### 2.6.1 Desenvolvimento de novas TZDs com potencial anti-inflamatório

Em razão do elevado potencial anti-inflamatório dos agonistas de PPAR $\gamma$  novos compostos tiazolidínicos, Tiazolidinedionas (TZDs) estão sendo extensivamente estudados. As estruturas químicas das novas TZDs passam por intenso planejamento com vistas a minimizar os efeitos adversos comumente observados pelas TZDs comerciais abolidas do mercado.

Os efeitos adversos comumente apresentados pela Troglitazona e Rosiglitazona são frequentemente associados a falha na seletividade ao PPAR $\gamma$ , os chamados efeitos “Off targets” (WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016). Comumente, as TZDs comerciais também ativam o receptor para ácido graxo livre (GPR40). Estudos recentes, mostram que a ativação do receptor GPR40 e/ou ativação da ERK também está associada à falha terapêutica dos agonistas de PPAR $\gamma$ , em decorrência de sua fosforilação (MANCINI; POITOUT, 2013; WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016).

Estudos de Docking e *in silico* auxiliam no desenvolvimento de novas moléculas com maior afinidade ao PPAR $\gamma$  com menores riscos de efeitos adversos. Em 2006, Mourão sintetizou uma nova série de TZDs: 5-arilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-dionas. Neste estudo, o composto LPSF/GQ-2 apresentou boa energia de ligação (estabilidade) ao PPAR $\gamma$  nos estudos de Docking (MOURÃO, 2006). Desde então, uma série de testes biológicos vem sendo realizados para avaliar a eficácia terapêutica frente a vários modelos inflamatórios.

Soares e Silva et al. (2013) avaliaram a tiazolidinadiona, LPSF/GQ2 em um modelo de aterosclerose. Neste modelo, LPSF/GQ-2 demonstrou reduzir a

resistência à insulina, áreas de lesões ateroscleróticas, proteção ao endotélio relacionadas ao efeito anti-inflamatório.

Soares e Silva et al. (2015) avaliaram a LPSF/GQ-2 em um modelo de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD). Neste modelo, os autores concluíram que LPSF/GQ-2 atua sobre o processo inflamatório reduzindo o recrutamento das células de Kupffer favorecendo a resolução da inflamação.

Outra tiazolidinadiona, a LPSF/RA-4, apresentou significativo efeito anti-inflamatório em um modelo de inflamação aguda. Barbosa et al. (2013) utilizando um modelo de pleurisia induzido por carragenina demonstrou que LPSF/RA-4 reduziu a produção de citocinas, assim como inibição do influxo de células inflamatórias. Os mecanismos associados a este efeito ainda não foram completamente elucidados.

### 3 JUSTIFICATIVA

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e sua manifestação mais severa denominada Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) caracterizam-se clinicamente pela presença de infiltrados bilaterais, edema e subsequente quadro de falência respiratória (WARE; MATTHAY, 2000). Atualmente, a LPA e SDRA são consideradas como importante causa de mortalidade em pacientes críticos (RUBENFELD et al., 2005; VILLAR et al., 2011). Estima-se que a SDRA apresenta uma taxa de mortalidade em torno de 40% em ambiente hospitalar (ESTENOSSORO et al., 2002; LAFFEY et al., 2016). Os mecanismos fundamentais de iniciação e propagação da LPA ainda não foram estabelecidos, apesar de mais de 50 anos de intensa investigação. Ainda não existem terapias efetivas para tratar a LPA/SDRA, portanto há uma necessidade crescente de novos alvos terapêuticos (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008; BLOT et al., 2017). Nesse aspecto, os agonistas do receptor de PPAR gama surgem como alvos promissores. Recentemente, duas novas Tiazolidinedionas (TZDs) LPSF/RA-4 e LPSF/GQ-2 demonstraram efeito protetor contra as alterações teciduais em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica respectivamente (BARBOSA et al., 2013; SOARES e SILVA et al., 2015). Porém, ainda não existem estudos que demonstrem o potencial efeito terapêutico dos novos compostos na LPA/SDRA induzida por LPS.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral:

Investigar o potencial anti-inflamatório dos novos derivados Tiazolidínicos (TZDs): LPSF/GQ-2 (*5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona*) e LPSF/RA-4 (*5,3-benzil-5-(1-Indol-3-Metileno)- tiazolidina-2,4-diona*) sobre o processo inflamatório no modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA).

### 4.2 Objetivos Específicos:

- a) Avaliar a eficácia das TZDs sobre a inibição da migração celular;
- b) Investigar a eficácia das TZDs sobre a injúria tecidual;
- c) Avaliar a ação das TZDs sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO);
- d) Analisar o efeito das TZDs sobre a expressão de iNOS e interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ );
- e) Avaliar o efeito dos compostos LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4 sobre os processos regulatórios do NF $\kappa$ B, vias de sinalização da MAPKs quinases (ERK, p38 e JNK) e PARP1.



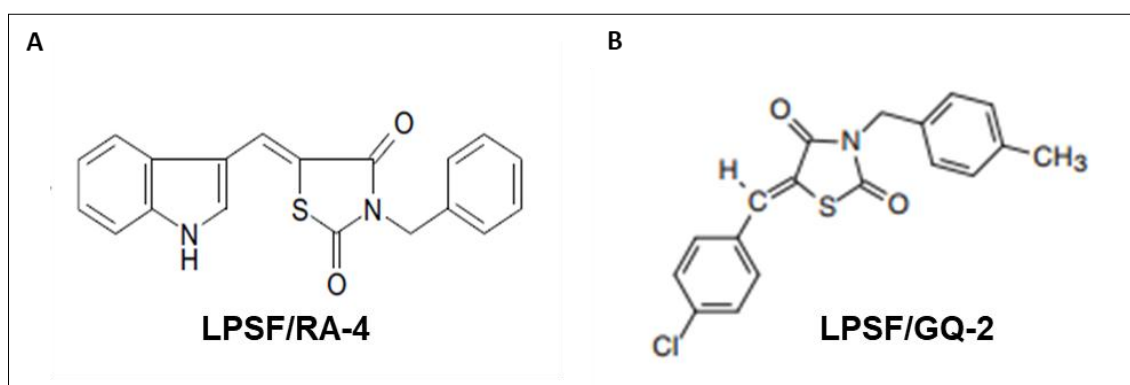
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção dos derivados tiazolidínicos

Os novos derivados Tiazolidínicos da série LPSF/GQ-2 (*5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona*) e LPSF/RA-4 (*5,3-benzil-5-(1-Indol-3-Metileno)-tiazolidina-2,4-diona*) foram cedidos pelo do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, localizado no Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A síntese das moléculas foram previamente descritas no estudo de Mourão (2006). As estruturas químicas dos compostos foram previamente comprovadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Infravermelho e Espectrometria de massas (Figura 8).

**Figura 8 - Estrutura química das novas Tiazolidinedionas (TZDs).**



Fonte: Barbosa (2013) e Soares e Silva (2013)  
 Legendas: A – LPSF/RA-4; B – LPSF/GQ-2.

### 5.2 Animais

Neste estudo foram utilizados cem camundongos machos BALB/c adultos com aproximadamente seis semanas, provenientes do Biotério de Criação do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). Os animais foram mantidos em ambiente controlado de umidade, 45%- 55%, temperatura, 18°C - 22°C, e luminosidade (12h/12h, fotoperíodo) com livre acesso a água e ração padrão. Foram realizadas duas repetições do experimento com todos os grupos para assegurar a reprodutibilidade. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações

e normas estabelecidas pelo CONCEA, protocolo nº101/2016 (CEUA/IAM/FIOCRUZ).

### 5.2.1 Desenho experimental:

Os camundongos BALB/c foram alocados aleatoriamente em cinco grupos experimentais utilizando dez animais em cada grupo (N=10):

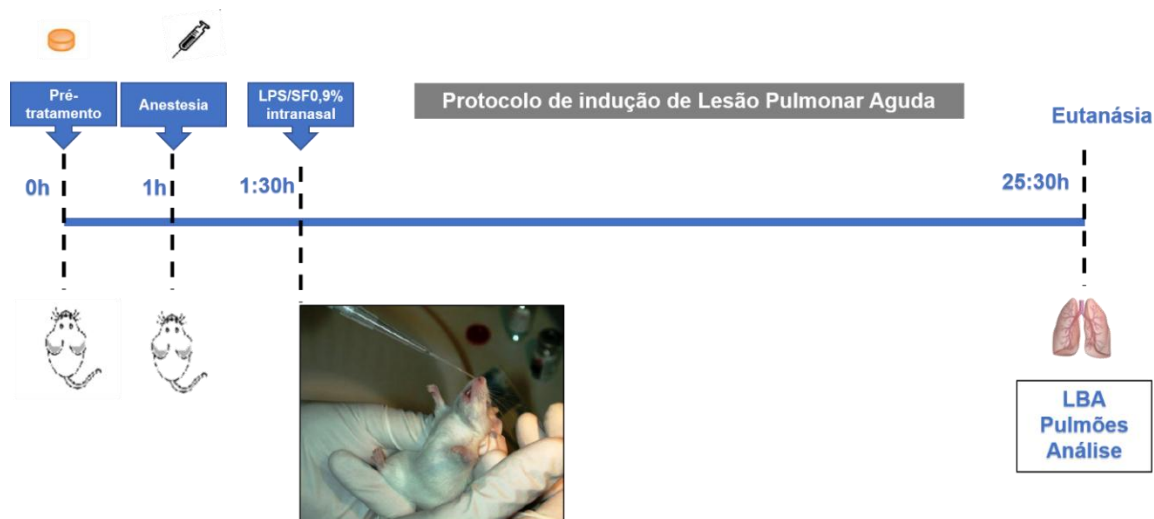
- a) **Controle**: Os animais receberam por gavagem 100 µL de água para injeção + 30 µL tween 20, uma hora antes da instilação de 25µL de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) por via intranasal (i.n.);
- b) **LPS**: Os animais receberam por gavagem 100 µL de água para injeção + 30 µL tween 20, uma hora antes da instilação de LPS (25µg/25µL) por via intranasal;
- c) **GQ-2 (30 mg/kg) + LPS**: Os animais receberam por gavagem LPSF/GQ-2 dissolvidos em água para injeção (100µL) + 30 µL tween20, uma hora antes da instilação de LPS (25µg/25µL) por via intranasal;
- d) **RA-4 (20mg/kg) + LPS**: Os animais receberam por gavagem RA-4 dissolvidos em água para injeção (100µL) + 30 µL tween 20, uma hora antes da instilação de LPS (25µg/25µL) por via intranasal;
- e) **DEXA (1mg/kg) + LPS**: Os animais receberam por gavagem dexametasona (Aché) dissolvida em água para injeção (100µL) uma hora antes da instilação de LPS (25µg/25µL) por via intranasal;

Os animais foram previamente anestesiados com uma mistura de Cetamina (100mg/mL) e Xilazina (10mg/mL) antes da instilação nasal de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich), previamente dissolvido em solução salina (NaCl, 0,9%) até a concentração de 1µg/1µL, sendo administrado 25 µL pela via intranasal (12,5µL por narina). Durante o procedimento foi utilizado uma ponteira de gel de eletroforese (Corning Axygen® TGL-200) que foi direcionada a abertura nasal, conforme o representado pela Figura 9.

As doses de LPSF/RA-4 e LPSF/GQ-2 foram previamente selecionadas considerando a melhor eficácia das mesmas em estudos anteriores de pleurisia para

a LPSF/RA-4; (BARBOSA et al., 2013) e aterosclerose para a LPSF/GQ-2; (SOARES SILVA et al., 2016).

**Figura 9. Esquema experimental de indução da LPA.**



Fonte: Elaborado pela autora a partir de Gualdi et al. (2010).

### 5.3 Eutanásia

Os animais 24hs após a etapa de desafio foram submetidos a eutanásia através da sobredose do anestésico Pentobarbital (3%). O procedimento obedeceu as normas de experimentação do Biotério de experimentação da Fiocruz em conformidade com as recomendações do CONCEA.

### 5.4 Contagem de células do Lavado Broncoalveolar

Após constatada a morte dos animais foi realizada a retirada do lavado broncoalveolar (LBA) utilizando a técnica de sucessivas aspirações com 1mL de PBS utilizando um cânula de polietileno intratraqueal. Em seguida, as células do LBA foram contadas utilizando um contador automático (Hematology Auto Analyzer, ABX Pentra 60, Japão). As células foram visualizadas em microscópio óptico e recontadas utilizando a câmara de Neubauer após diluição na proporção de 1:20 com a solução de Türk.

### 5.5 Dosagem indireta dos níveis de óxido nítrico (NO)

A mensuração dos níveis de NO foi realizada a partir da detecção de seus metabólitos estáveis, nitrito e nitrato como previamente descrito (MOSHAGE et al., 2005; SANTOS et al., 2014). A reação de Griess colorimétrica foi utilizada para determinação do óxido nítrico no LBA. Em duplicata 50µL de LBA foi adicionado em uma placa de ELISA contendo 96 poços. Em seguida, o mesmo volume de reagente de Griess foi acrescentado. O reagente de Griess é composto por 1% de sulfanilamida diluída em 2.5% de ácido fosfórico (solução A) e N-1 Naftil-etilenodiamina diluída em ácido fosfórico (Solução B). O preparo da curva padrão foi realizado a partir da solução de nitrito de sódio a 100µM diluída sericamente em PBS. Após a adição do reagente de Griess, a placa foi incubada por 10 min, em ambiente escuro. Em seguida, realizou-se leitura da absorbância em espectrofotômetro (490nm). A absorbância de cada amostra foi comparada com a curva padrão e os resultados expressos como níveis molares de NO (nitrato/nitrito, µM) utilizando o programa GraphPad Prism (v.5.0).

### 5.6 Dosagem de MPO

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando a metodologia de Bradley et al. (1982) com modificações. Fragmentos do pulmão (250 mg/mL) foram adicionados a 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (80 mM) e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Em seguida, os fragmentos foram homogeneizados e centrifugados durante 30 minutos a 20.000g, 4°C. Alíquotas (20 µl) do sobrenadante foram distribuídas em placa de 96 poços e adicionado 200 µl da solução de O-dianisidina (16,7 mg de o-dianisidina [Sigma], 90 ml de água deionizada, 10 ml de tampão de fosfato de potássio, 50 µl de peróxido de hidrogênio a 1%). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas na absorbância de 450 nm e expressa como mDO/biopsia.

## 5.7 Microscopia óptica e técnicas de coloração

Fragmentos pulmonares foram fixados utilizando a solução fixadora de Bouin, preparado a base de solução saturada de ácido pícrico (1%), formaldeído (37%) e ácido acético (40%) por oito horas. Em seguida, os fragmentos foram colocados no histotécnico (OMA DM40, São Paulo) para as sequências de desidratação, diafanização e inclusão, utilizando concentrações crescentes de etanol, xilol e parafina respectivamente. Após o emblocamento, foram feitos cortes de 5 µm, utilizando o micrótomo (Leica, RM2125 RTS), em seguida os cortes foram montados e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico Leica DM500, utilizando-se o software Leica Applications Suite (version 3.3.0) para visualização do parênquima pulmonar, foram utilizados os aumentos de 100x e 400x.

## 5.8 Obtenção do escore tecidual

A quantificação das alterações teciduais foram feitas a partir da adaptação do escore para avaliação de LPA em modelos animais (MATUTE-BELLO et al., 2011). Nesse escore foram considerados pontos de maior evidência de LPA. Foram tiradas cerca de vinte micrografias por grupo experimental, utilizando-se o mínimo de cinco animais por grupo (400x, magnificação das imagens, Leica DM500).

**Quadro 3 - Parâmetros analisados para obtenção do escore tecidual**

Parâmetro	Escore por campo		
	0	1	2
A. PMN no espaço alveolar	nenhum	1- 5	>5
B. PMN no espaço intersticial	nenhum	1-5	>5
C. Membranas hialinas	nenhum	1	>1
D. Presença de debris proteáceo nos espaços alveolares	nenhum	1	>1

$$\text{Escore} = [(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D)] / (\text{Número de campos})$$

Fonte: Adaptado de Matute-Bello et al. (2011).

Legendas: PMNs – Polimorfonucleares

### 5.9 Imunoistoquímica (iNOS, IL-1 $\beta$ )

Os cortes destinados a imunoistoquímica foram aderidos em lâminas previamente tratadas com 3- Aminopropiltriétoxissilano (APES, Sigma). Os cortes foram desparafinizados utilizando gradientes de etanol e reidratados. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio a 10%(v/v) durante quinze minutos. Na etapa de recuperação antigênica utilizou-se uma solução de citrato em pH 6, seguida de aquecimento em Steamer, a temperatura de 90 graus por uma hora. Após sucessivas lavagens em PBS (pH 7.2), foi realizado o bloqueio com proteína albumina do soro bovino (BSA, 1%, Sigma- Aldrich) durante uma hora. Após finalizada a etapa de bloqueio, foram incubados *overnight* os anticorpos primários iNOS (abcam, USA, 1:250); IL-1 $\beta$  (GenWay, USA, 1:100). A detecção da ligação antígeno anticorpo foi visualizada a partir da reação avidina-biotina peroxidase, utilizando o Kit Dako Universal (LSAB peroxidase, USA) e a 3.3 Diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina. A quantificação das marcações foi realizada a partir da análise das fotomicrografias (aumento de 400x) por densidade de pixels, utilizando-se o software GIMP (versão 2.6, plataforma GNU, UNIX).

### 5.10 Western blot (IL-1 $\beta$ ; IL-6; TNF $\alpha$ ; I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , NF $\kappa$ B, p-NF $\kappa$ B; p38 MAPK, p-p38 MAPK; ERK, p-ERK, JNK, pJNK, anti-PARP1)

Após a coleta dos fragmentos pulmonares, os pulmões foram homogeneizados em agitador (Wheaton Overhead Stirrer, 903475) utilizando um coquetel de extração composto por EDTA (10mM), Fenil-metil-sulfonilfluorano (PMSF, 2mM), Fluoreto de sódio (NaF, 100mM), Pirofosfato de sódio (10mM), Ortovanadato de sódio (NaVO<sub>4</sub>,10mM), Aprotinina (10mg) e hidroximetilamimetano (TRIS, pH 7.4). Os homogenatos foram centrifugados a 3000g por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C até a preparação das amostras para o imunoblot. A quantificação proteica foi determinada a partir do método de Bradford utilizando o BSA como proteína padrão. As proteínas foram normalizadas (40 $\mu$ g) para a mesma concentração em gel de poliacrilamida para realização da eletroforese. As proteínas do gel foram transferidas para um membrana de

nitrocelulose (Bio-Rad, USA, Ref. 162-0115). Na etapa de bloqueio utilizou-se uma solução contendo proteínas do leite em TBS-T (Tampão Tris, NaCl 0,9% +0,05%Tween20, pH 7.4). Os anticorpos primários foram incubados de acordo com as recomendações do fabricante (overnight 4°C ou três horas, 20-25°C). Foram utilizados as seguintes diluições de anticorpos primários: anti-IL-1 $\beta$  (1: 2000) ; anti IL-6 (1: 1000) ; anti-TNF $\alpha$  (1: 1000) ; anti-iNOS (1: 1000); anti I $\kappa$ B $\alpha$  (1: 1000), anti -p-I $\kappa$ B $\alpha$  (1: 1000) , anti- NF $\kappa$ B (1:1000), anti-p-NF $\kappa$ B (S529,1:1000); p38 (1:1000); anti-p-p38 (1:1000); anti-ERK (1:1000); p-ERK (1:1000); anti-JNK, anti-p-JNK (1:1000) e anti-PARP (1:1000). Foram utilizados anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-rabbit (Sigma-aldrich, ref. A6154, 1:80.000) e anti-mouse (Sigma-aldrich, Ref.A5420, 1:8000). Todos as diluições utilizaram TST diluído em proteína de leite a 1% (anticorpos secundários) ou 3% (anticorpos primários). A visualização das bandas no C-Digit Blot Scanner (LICOR, Nebraska, USA) foi ocorreu após a adição de um agente potencializador de quimioluminescência (Super signal, Pierce, Ref. 34,080). O software ImageJ 1.38 foi utilizado para a quantificação das imagens, os resultados para cada proteína investigada foram confirmadas por no mínimo três repetições. A beta actina (Sigma-Aldrich, 1: 2000, USA) foi utilizada como controle dos níveis de proteína entre grupos, sendo também utilizada a forma não fosforilada para quantificações relativas. Os resultados foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias.

### **5.11 Análise Estatística**

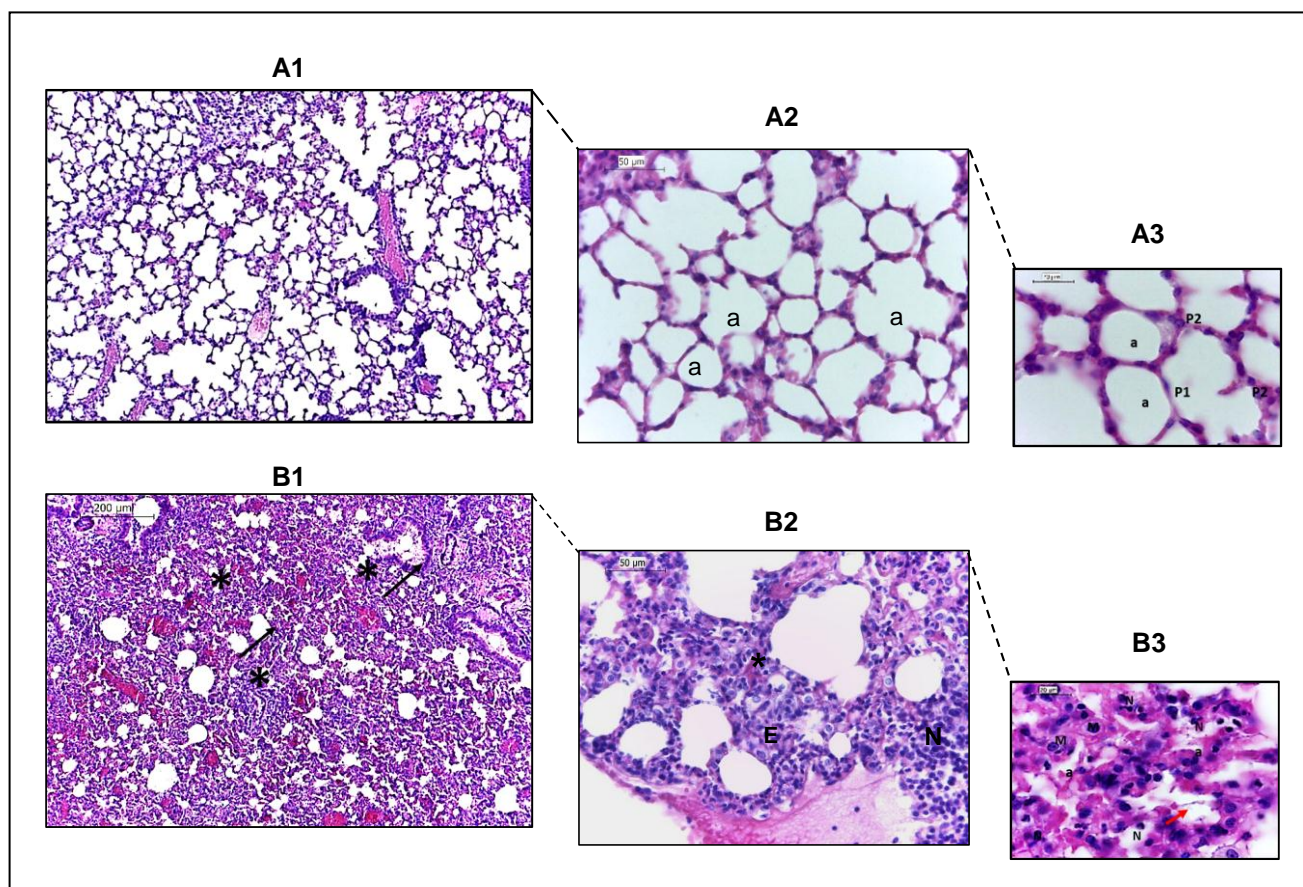
Os dados foram analisados através do ANOVA one-way, seguido de teste de Tukey usando o programa GraphPad Prism software (V. 5.0). Os dados do modelo experimental são representativos de duas repetições do experimento. Os dados do western blotting são representativos pelo menos de três repetições para cada proteína analisada. Em todas as análises, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Avaliação das alterações histológicas no modelo de LPA

As amostras dos tecidos pulmonares foram coletadas 24 horas após o desafio com LPS intranasal e processadas para análise histológica. A análise microscópica do tecido pulmonar não demonstrou alterações no grupo controle, o qual apresentava a estrutura normal dos alvéolos, sem sinais de inflamação ou espessamento da parede alveolar (Figura 10).

**Figura 10 - Análise histológica dos pulmões 24hs após instilação nasal.**



Fonte: Elaborado pela autora.

Legendas: A- grupo controle: A1 (200µm), A2-(40µm) e A3 (20 µm). B- grupo LPS: B1 (200µm), B2 (40 µm) C3 (20µm). a – área alveolar; P1- pneumócito tipo I; P2- pneumócito tipo II; \* - focos hemorrágicos; seta preta – áreas de infiltração celular; seta vermelha – debris proteínáceos; N- polimorfonucleares. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina.

O grupo LPS mostrou áreas de intensa infiltração celular e espessamento da parede alveolar, inúmeros focos hemorrágicos e edema, conforme observado na



Figura 10, B1-B2 (parênquima) e B3 (alvéolos). O escore tecidual quantificou características chaves, tais como: presença de Polimorfonucleares (PMNs), membranas hialinas e debris proteínáceo.

Estes efeitos apontam que o modelo foi capaz de reproduzir as características chaves da LPA. Além disso, a análise do escore tecidual também evidência esses efeitos comparativamente sobre o grupo controle (Figura 10, A1-A3) controle versus LPS (\*P<0,05).

## 6.2 Efeito das novas TZDs e DEXA sobre as alterações histológicas

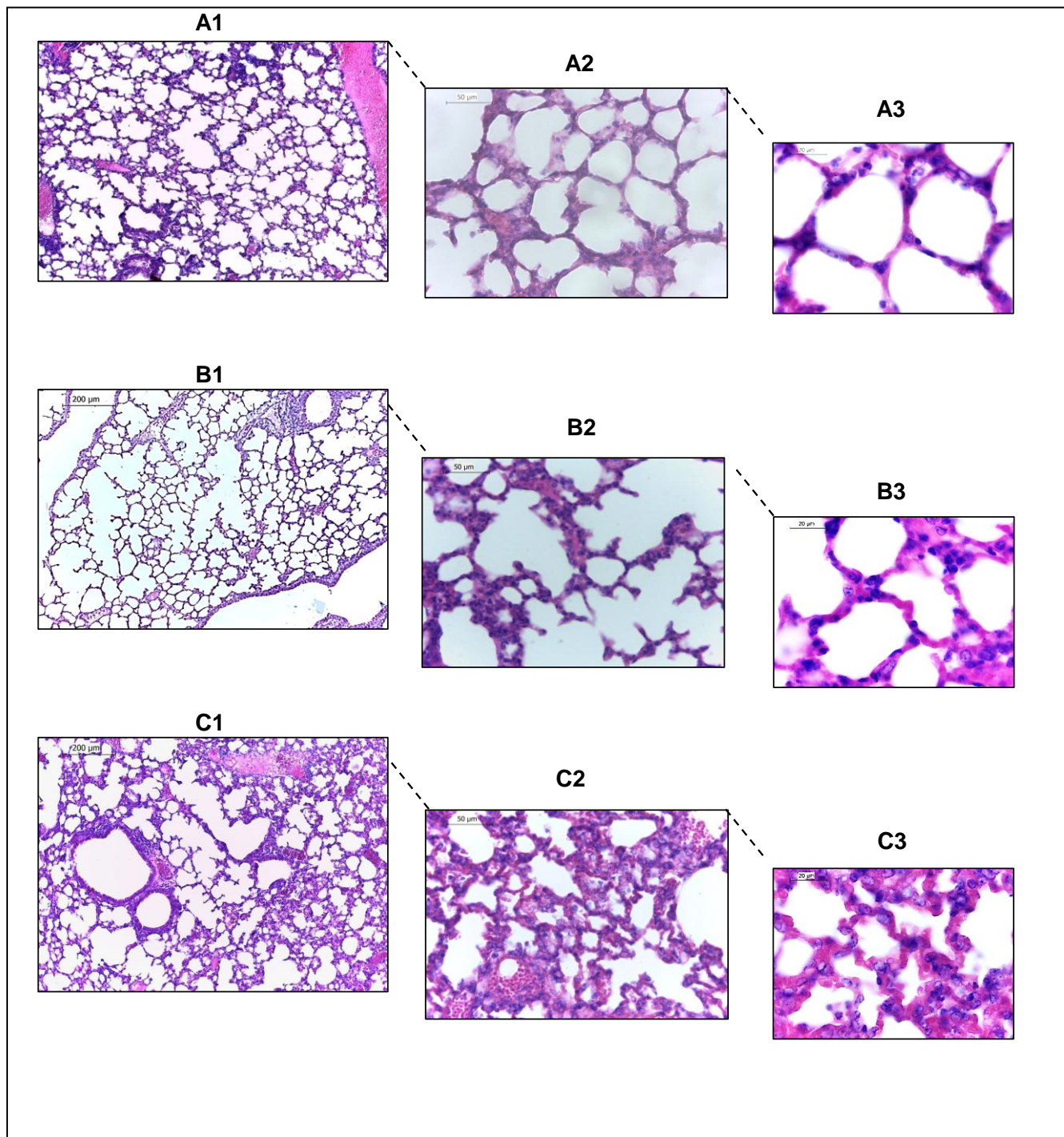
A avaliação morfológica dos tecidos pulmonares submetidos ao pré-tratamento evidenciaram o efeito protetor das TDZs, em especial a LPSF/GQ-2. Conforme observados nas imagens (Figura 11, A1-A3). Nos animais submetidos ao pré-tratamento com LPSF/GQ-2 a arquitetura alveolar foi bastante preservada, com poucas áreas de infiltração, focos hemorrágicos e edema. A LPSF/GQ-2 apresentou grau de proteção tecidual superior a LPSF/RA-4, apresentando morfologia similar ao grupo controle.

O tratamento com LPSF/RA-4 também ofereceu proteção frente as alterações induzidas pela LPA, porém ainda é notável a presença de infiltrados inflamatórios e espessamento alveolar, conforme visualizado na Figura 11, B1-B3.

O escore tecidual quantificou características chaves, tais como: presença de polimorfonucleares, membranas hialinas e debris proteínáceo. Em geral, o pré-tratamento com as novas TZDs promoveram benefícios sobre as alterações morfológicas conforme representado graficamente pelo escore tecidual, Figura 12. ##LPS versus LPSF/GQ-2 ( $p<0,001$ ) e #LPS versus RA-4 ( $p<0,01$ ).

O pré-tratamento com dexametasona (1mg/kg) obteve grau de proteção mediano frente as modificações teciduais provocadas pelo LPS. As imagens mostram menor número de áreas de infiltração celular, porém o espessamento alveolar ainda se mostrou bastante evidente nos animais deste grupo, Figura 11, C1-C3 e Figura 12. Dados do escore tecidual, LPS versus DEXA (##  $P<0,001$ ).

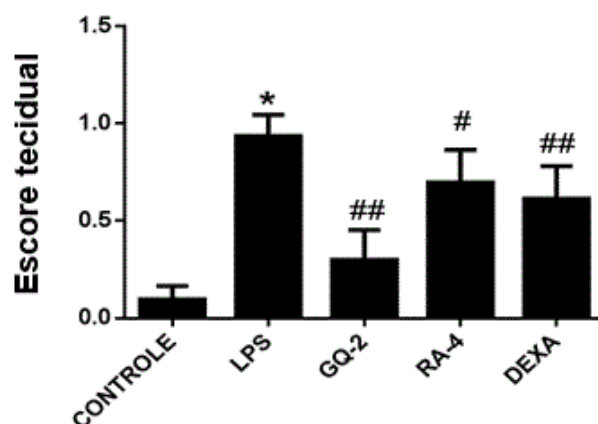
**Figura 11 - Análise tecidual dos grupos pré-tratados**



Fonte: Elaborado pela autora

Legendas: A- grupo LPSF/GQ-2: A1 (200µm), A2-(40µm) e A3 (20 µm). B- grupo LPSF/RA-4 +LPS: B1 (200µm), B2 (40 µm) C3 (20µm). C- grupo DEXA: A1 (200µm), A2-(40µm) e A3 (20 µm). Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina-Eosina

Figura 12 - Escore tecidual.



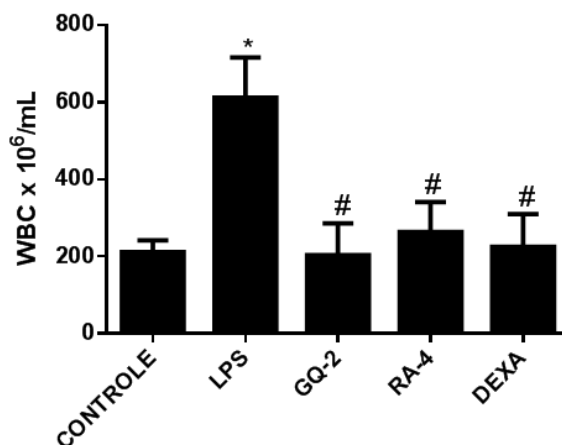
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Quantificações realizadas a partir de 20 campos, utilizando a objetiva de 40x, aumento 400x, foram utilizados no mínimo 5 animais diferentes em cada grupo analisado. Controle x LPS \*P<0,05; LPS x grupos tratados # P<0,01 e ## P<0,001.

### 6.3 Avaliação dos efeitos das novas TZDs sobre a infiltração celular, níveis de MPO e NO

A análise da contagem de células no Lavado Broncoalveolar (LBA) utilizando o contador automático ABX (Pentra 60, Japão) revelou intensa migração celular após o desafio no grupo LPS (Figura 13). Em contraste, as Tiazolidinedionas (LPSF/GQ-2, LPSF/RA-4) e DEXA reduziram a infiltração celular.

Figura 13 - Avaliação da migração celular no LBA após instilação nasal

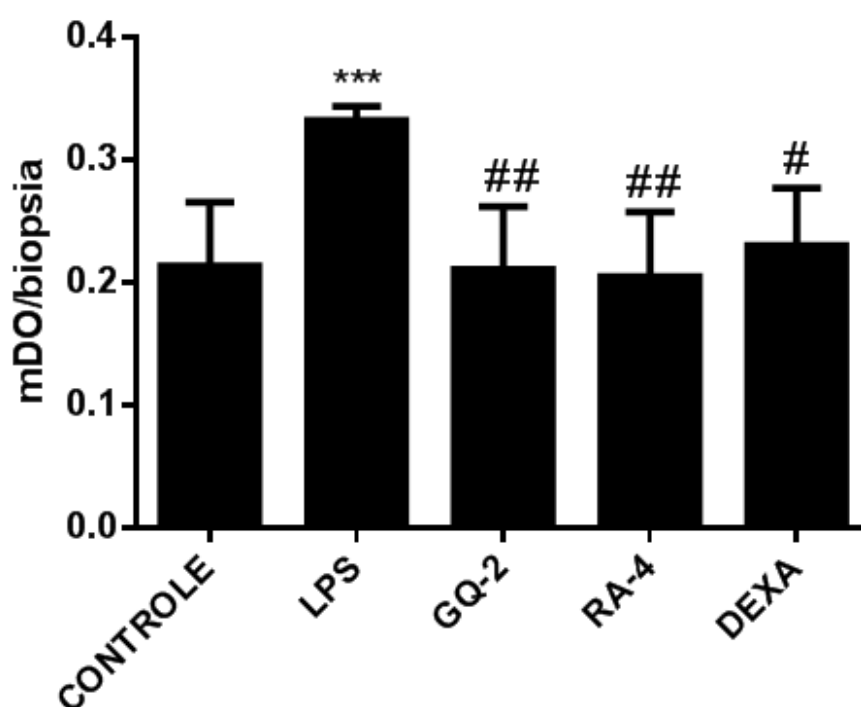


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: WBC – Número de células totais x 10<sup>6</sup>; \* Controle versus LPS (p<0,05); LPS versus grupos (#p<0,01).

A Mieloperoxidase (MPO) uma enzima abundante nos neutrófilos estava significativamente aumentada no grupo LPS (Figura 14), indicando alto percentual de neutrófilos dentre as células provenientes do infiltrado inflamatório no tecido do grupo LPS. Os grupos tratados com LPSF/GQ-2 (30mg/kg), LPSF/RA-4 (20mg/kg) e DEXA (1mg/kg) obtiveram similar padrão de redução para os níveis de MPO tecidual.

**Figura 14 - Avaliação dos níveis de MPO tecidual**

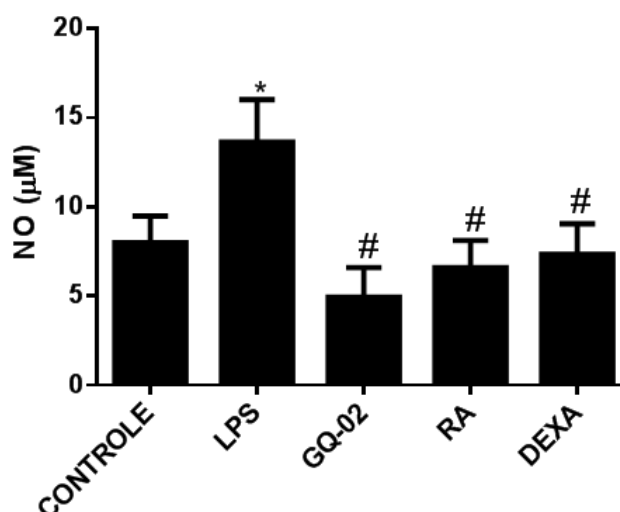


Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Controle versus LPS (\*\*p<0,001); LPS versus grupos (#p<0,01;##p<0,05).

O catabolismo do óxido nítrico (NO) é considerado um importante indicador do estresse oxidativo no processo inflamatório. A análise dos metabólitos estáveis (nitrato/nitrito) foi feita a partir da reação de Griess. O grupo LPS apresentou significativo aumento dos níveis de NO (nitrato/nitrito) em comparação ao grupo controle (\*p<0,05) (Figura 15). O qual foi significativamente reduzido pelas TZDs e DEXA sendo o melhor efeito atribuído ao grupo LPSF/GQ-2 (#p<0,05), conforme representado abaixo na figura 15.

**Figura 15 - Quantificação indireta de NO pelos níveis de nitrato/nitrito.**



Fonte: Elaborado pela autora

Legendas: Controle versus LPS (\* $p < 0,05$ ); LPS versus grupos (# $p < 0,05$ ).

#### **6.4 Efeitos inibitórios das novas TZDs sobre a expressão de iNOS e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ )**

A análise da marcação tecidual para iNOS revelou baixa positividade para marcação no grupo controle (Figura 16, A). Em contraste, o grupo LPS apresentou intensa marcação para iNOS em todo o parênquima pulmonar, conforme disposto na Figura 16, A. A análise quantitativa das imagens da imunistoquímica (Figura 16, B), confirma a maior positividade de iNOS para o grupo LPS, controle versus LPS \* $p < 0,05$ .

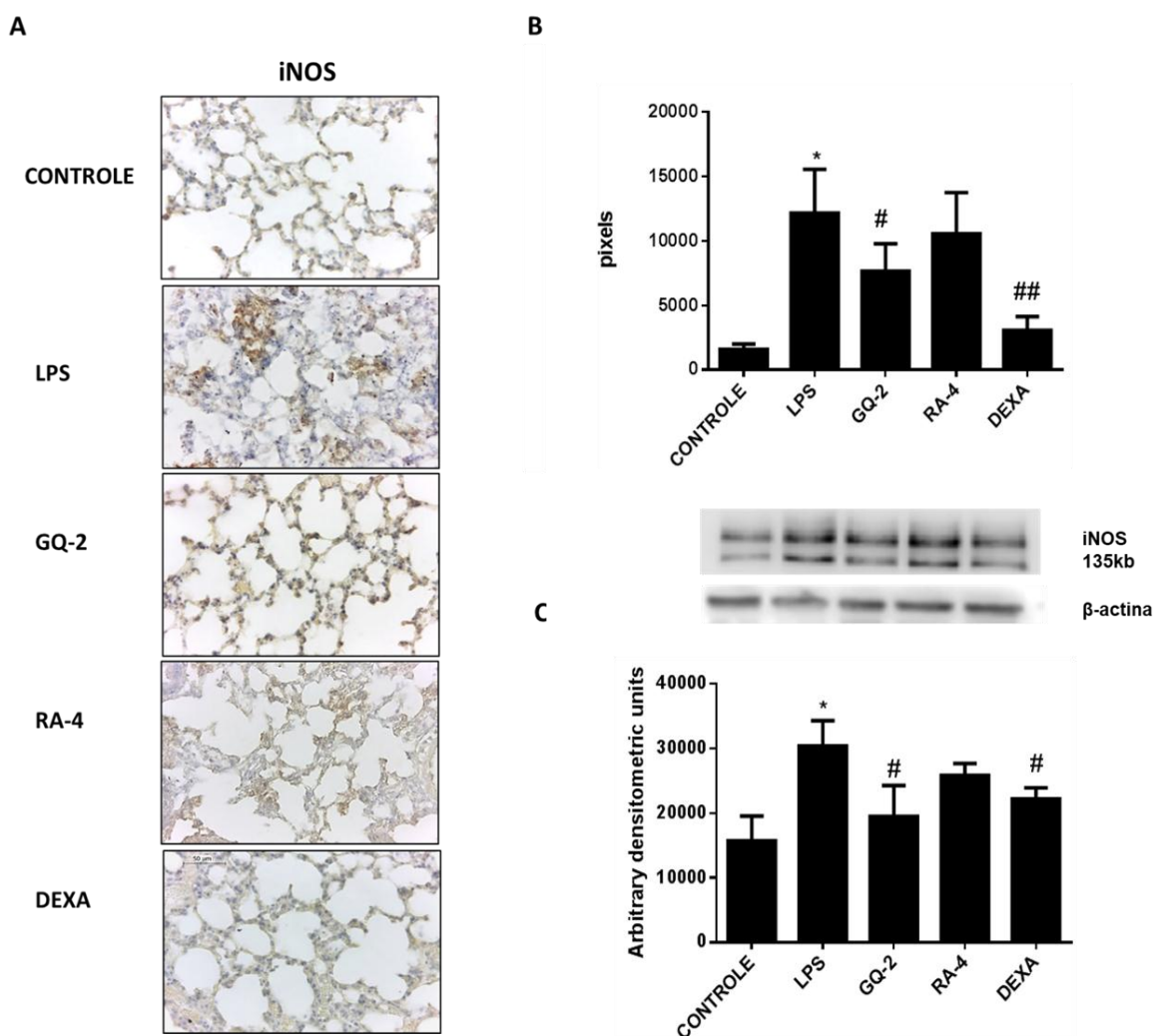
A análise quantitativa das imagens demonstrou marcação significativamente baixa para iNOS nos grupos previamente tratados com LPSF/GQ-2 e DEXA, porém a inibição não foi significativa nos animais tratados com LPSF/RA-4.

Os resultados do Western Blot para análise da expressão tecidual para iNOS confirmaram os dados obtidos pela Imunistoquímica. Novamente, o grupo LPSF/RA-4 não apresentou redução significativa para expressões iNOS. Apenas os grupos tratados apenas o LPSF/GQ-2 e o DEXA apresentaram efeitos inibitórios frente ao indução da iNOS pelo LPS (Figura 16, C).

A análise da expressão da imunomarcação para IL-1 $\beta$  apresentou padrão similar aos resultados obtidos com a iNOS. No grupo LPS houve aumento da positividade para marcação de IL-1 $\beta$  no grupo LPS (\* $p < 0,05$ , LPS versus controle). A

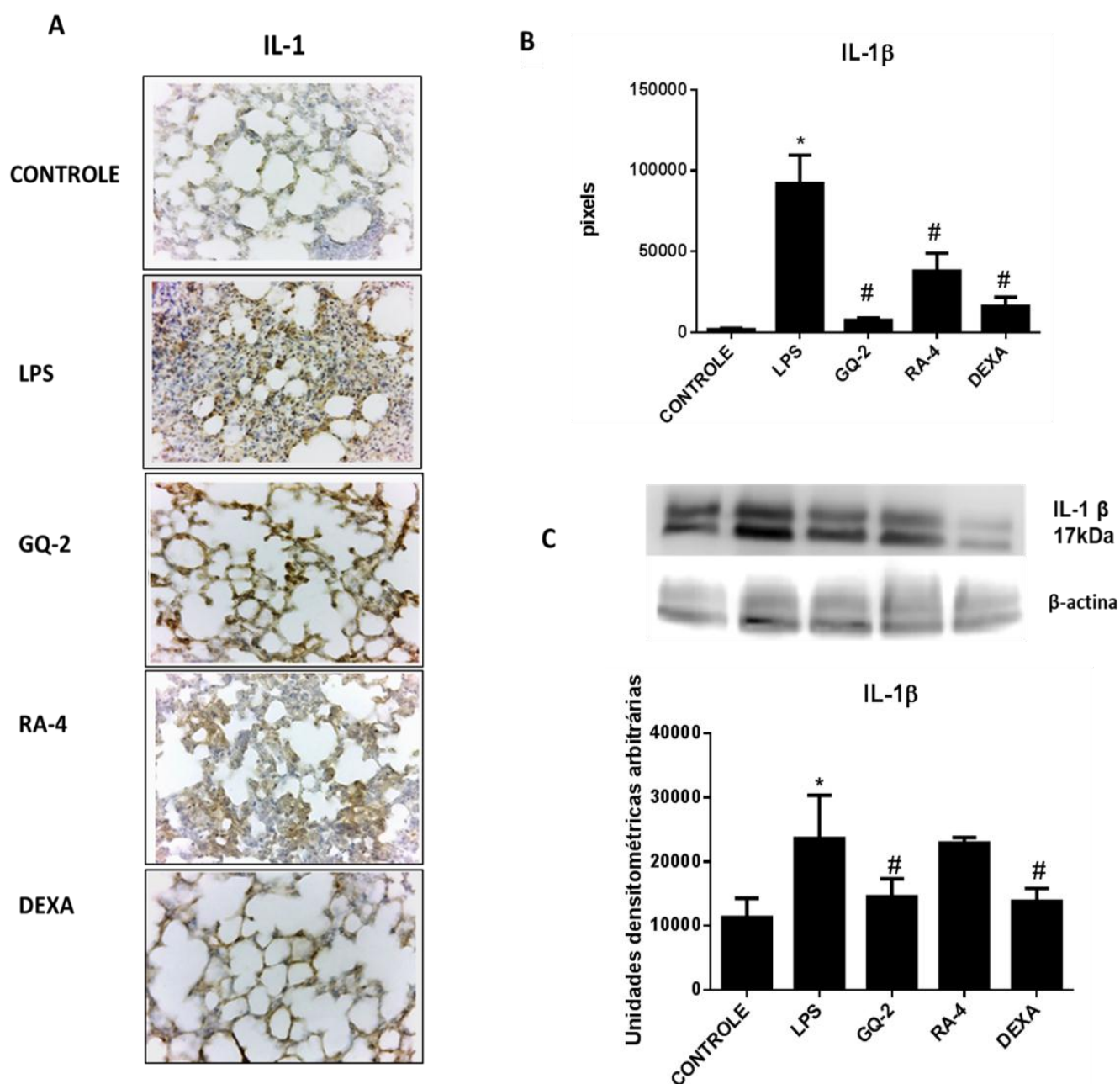
análise das imagens mostra que a marcação ocorreu de forma difusa no parênquima pulmonar (Figura 17, A) em geral próximo a regiões de infiltrados celulares inflamatórios. A análise quantitativa das imagens (Figura 17, B) mostra redução significativa da imunomarcação em todos os grupos previamente tratados com as novas TZDs e dexametasona (LPS versus GQ-2, # $p < 0,001$ ; LPS versus RA-4 ou DEXA, # $p < 0,01$ ). Porém, os dados do Western Blot não confirmaram os efeitos inibitórios observados na análise quantitativa das imagens para o grupo LPSF/RA-4 que permaneceu com altos níveis de expressão de IL-1 $\beta$ , semelhantes ao grupo LPS ( Figura 17, C).

**Figura 16 - Avaliação da imunomarcação e expressão de iNOS tecidual.**



Fonte: Elaborada pela autora. Legendas: A- Imunoistoquímica para iNOS, aumento 400x, barras 50 $\mu$ m. B – Quantificação da imunomarcação para iNOS tecidual, controle versus LPS \* $p < 0,05$ , LPS versus LPSF/GQ-2 # $p < 0,01$  e LPS versus DEXA ## $p < 0,001$ . C- Western blot para iNOS tecidual, controle versus LPS \* $p < 0,05$ , LPS versus grupos #  $p < 0,05$  (LPSF/GQ-2) e ## $p < 0,001$  (DEXA).

**Figura 17 - Avaliação da imunomarcção tecidual e expressão para IL-1 $\beta$**



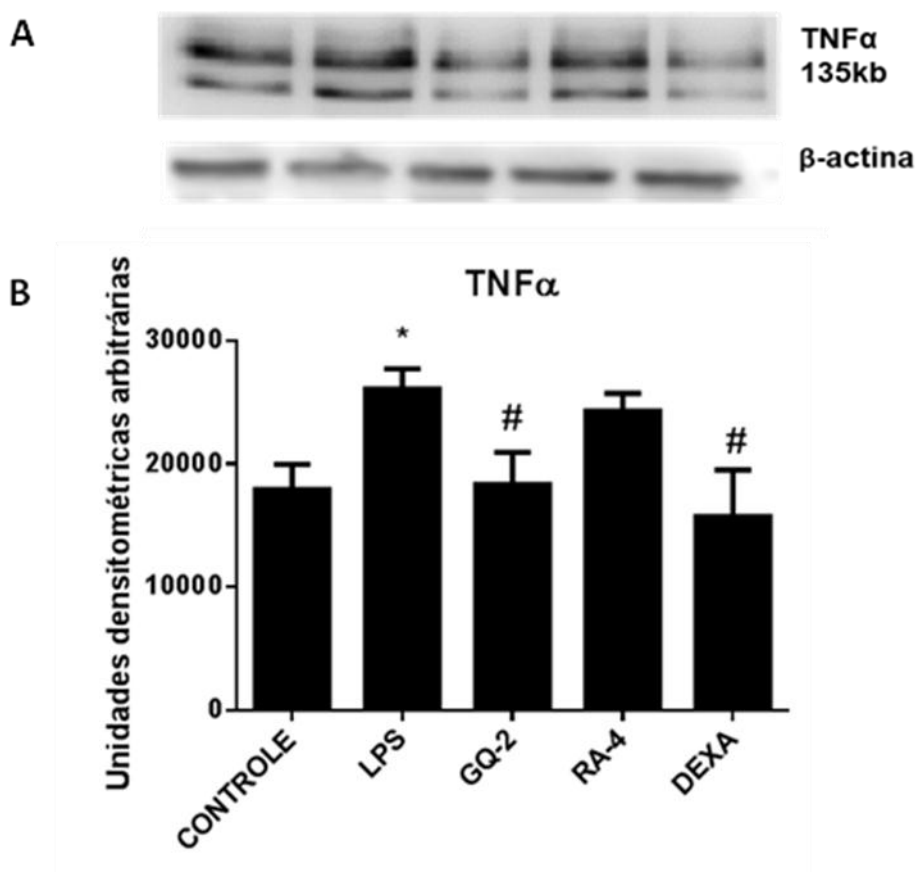
Fonte: Elaborado pela autora

Legendas: A - Imunoistoquímica para IL-1 $\beta$ , aumento 400x, barras 50 $\mu$ m. B - Quantificação da imunomarcção para para IL-1 $\beta$  tecidual, controle versus LPS \* $p$ <0,05, LPS versus LPSF/GQ-2 , LPSF/RA-4 ou DEXA # $p$ <0,01. C- Western blot para para IL-1 $\beta$  tecidual, controle versus LPS \* $p$ <0,05, LPS versus grupos #  $p$ <0,01.

O TNF $\alpha$  considerado um importante marcador da inflamação aguda, produzido por macrófagos e PMNs. A análise da expressão de TNF $\alpha$  mostra expressão significativamente aumentada no grupo LPS (\* $p$ <0,05, LPS versus controle). O qual foi significativamente reduzido nos grupos previamente tratados

com LPSF/GQ-2 e DEXA (#  $p < 0,05$ ) que apresentaram níveis similares ao grupo controle (Figura 18).

**Figura 18 - Avaliação da expressão tecidual de TNF $\alpha$**



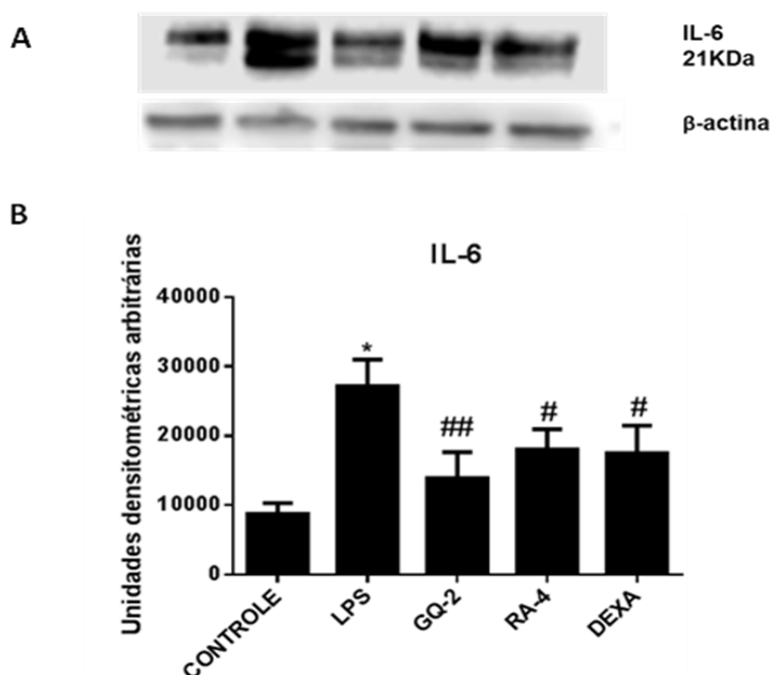
Fonte: Elaborado pela autora

Legendas: A – Imagem da revelação das bandas do western blotting, a beta actina foi utilizada como controle endógeno. B – Gráfico da quantificação da expressão de TNF $\alpha$ , os resultados foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias, Controle versus LPS\*  $p < 0,05$ ; LPS versus grupos #  $p < 0,05$ .

Os níveis de expressão para IL-6, principalmente envolvida no recrutamento de neutrófilos, também foram avaliados neste modelo. Os dados obtidos no Western blotting reflete os dados obtidos na contagem celular e MPO tecidual, demonstrando significativo aumento no grupo LPS (controle versus LPS, \* $p < 0,01$ ). Todos os grupos pré-tratados obtiveram redução significativa para IL-6 com destaque para o grupo LPSF/GQ-2 que obteve o melhor grau de inibição, LPS versus grupos, # $p < 0,05$  (Figura 19.) .



**Figura 19 - Avaliação da expressão tecidual para IL-6**



Fonte: Elaborado pela autora;

Legendas: A - Imagem da revelação das bandas do western blotting para IL-6, a beta actina foi utilizada como controle endógeno. B – Gráfico da quantificação da expressão de IL-6. Os resultados foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias, Controle versus LPS\*  $p < 0,01$ ; LPS versus grupos #  $p < 0,05$ .

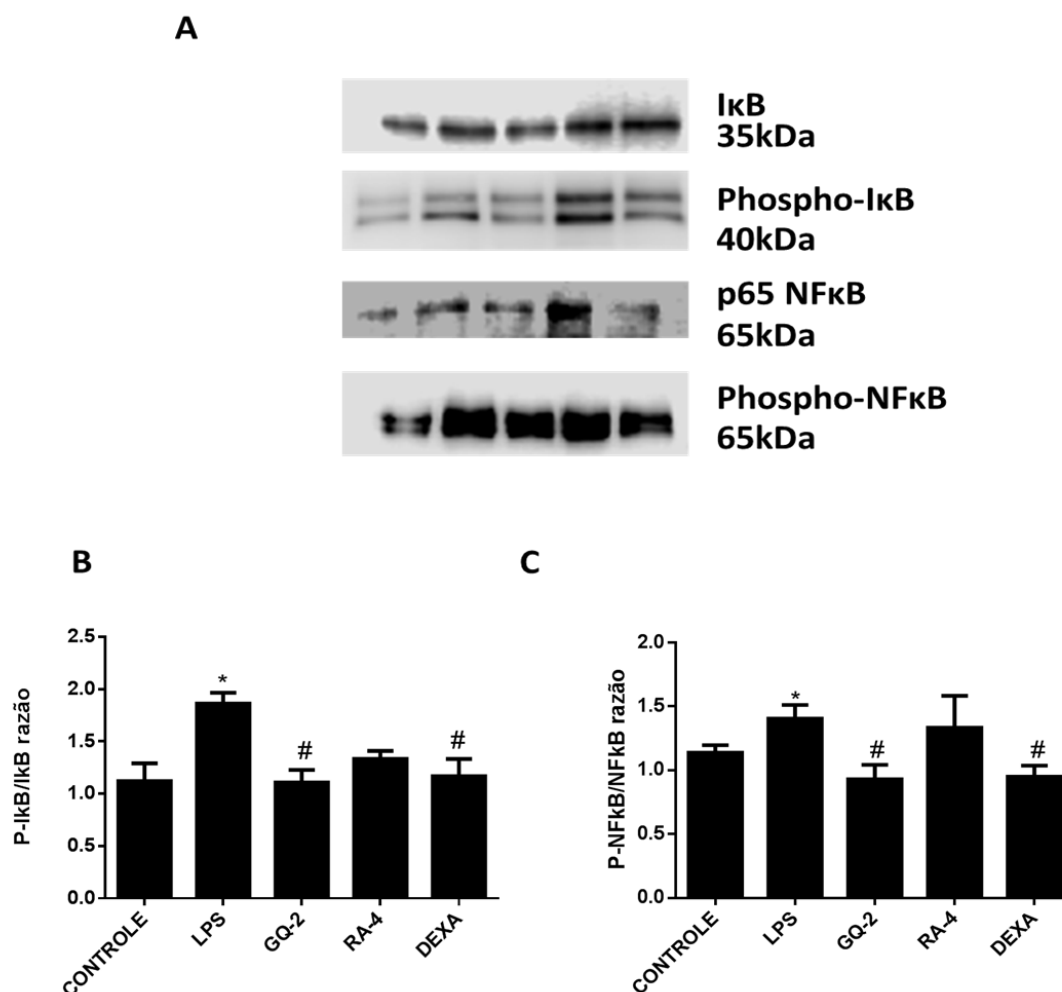
### 6.5 Resposta sobre a avaliação da expressão dos níveis de NFκB e IκB

O fator nuclear kappa-B (NFκB) está implicado com a indução da expressão de múltiplos fatores pro-inflamatórios. As proteínas IκB ligam-se ao NFκB no citoplasma impedindo sua importação para o núcleo celular e consequentemente sua atividade transcricional. A fosforilação aumentada do IκB é um indicativo que maior fração NFκB liberado no citoplasma pode ser transportado para o núcleo celular e induzir a expressão de citocinas e fatores inflamatórios. O grupo LPS apresentou níveis aumentados de IκB fosforilada em comparação a fração não fosforilada comparativamente ao grupo controle (Figura 20, A e B;  $p < 0,05$ ).

Os grupos tratados com LPSF/GQ-2 e DEXA mantiveram níveis de expressão muito similares ao grupo controle (LPS versus grupos, #  $p < 0,05$ ). Em contraste, o grupo LPSF/RA-4 obteve maior aumento da expressão de IκB fosforilada não apresentando, portanto, inibição significativa.

O NFκB em sua forma fosforilada aumenta sua atividade transcricional para a importação nuclear. Os resultados da expressão do NFκB fosforilado e não fosforilado refletem a análise da expressão do IκBα, indicando aumento considerado significativo para o grupo LPS ( $p < 0,05$ ) e redução nos grupos tratados com LPSF/GQ-2 e DEXA ( $\#p < 0,05$ ). O grupo LPSF/RA-4 permaneceu com níveis de expressão comparativamente elevados similares ao grupo LPS (Figura 20, A e C).

**Figura 20 - Níveis relativos de expressão de IκB e NFκB fosforilados**



Fonte: Elaborado pela autora

Legendas: A – Visualização das bandas da imunodeteção por western blotting marcadas com IκB, p-IκB, p65 (NFκB) e p-p65 NFκB). B – quantificação relativa da fração fosforilada sobre a não fosforilada (IκB/ p-IκB). C – quantificação relativa da fração fosforilada sobre a não fosforilada de NFκB (NFκB/p-NFκB). Os resultados gráficos foram expressos na forma de razão da fração fosforilada das proteínas sobre a não fosforilada. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos, \* controle versus LPS, # LPS versus grupos.

## 6.6 Avaliação da expressão das MAPKs (ERK, JNK, p38)

A sinalização das MAPKs está implicada na expressão de diversos fatores inflamatórios e ativação do NFκB. A instilação nasal de LPS aumentou significativamente a expressão da fração fosforilada de ERK, JNK e p38 no grupo LPS, indicando intensa ativação da sinalização das MAPKs (Figura. 21, A). Este resultado reflete os dados obtidos pela análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias, iNOS e NFκB alcançados após 24 horas após a instilação nasal de LPS.

Os pré-tratamentos resultaram em respostas diferenciadas sobre a expressão relativa das formas fosforiladas das MAPKs (ERK, JNK e p38). As TZDs apresentaram perfis antagônicos frente a expressão das formas fosforiladas ativas das MAPKs. O grupo LPSF/RA-4 permaneceu com elevada proporção das formas fosforiladas para ERK, JNK e p38 (Figura 21) favorecendo um perfil inflamatório. Estes dados podem explicar em parte, os achados obtidos sobre o aumento na expressão do NFκB, IκB fosforilado e não redução das citocinas pró-inflamatórias analisadas.

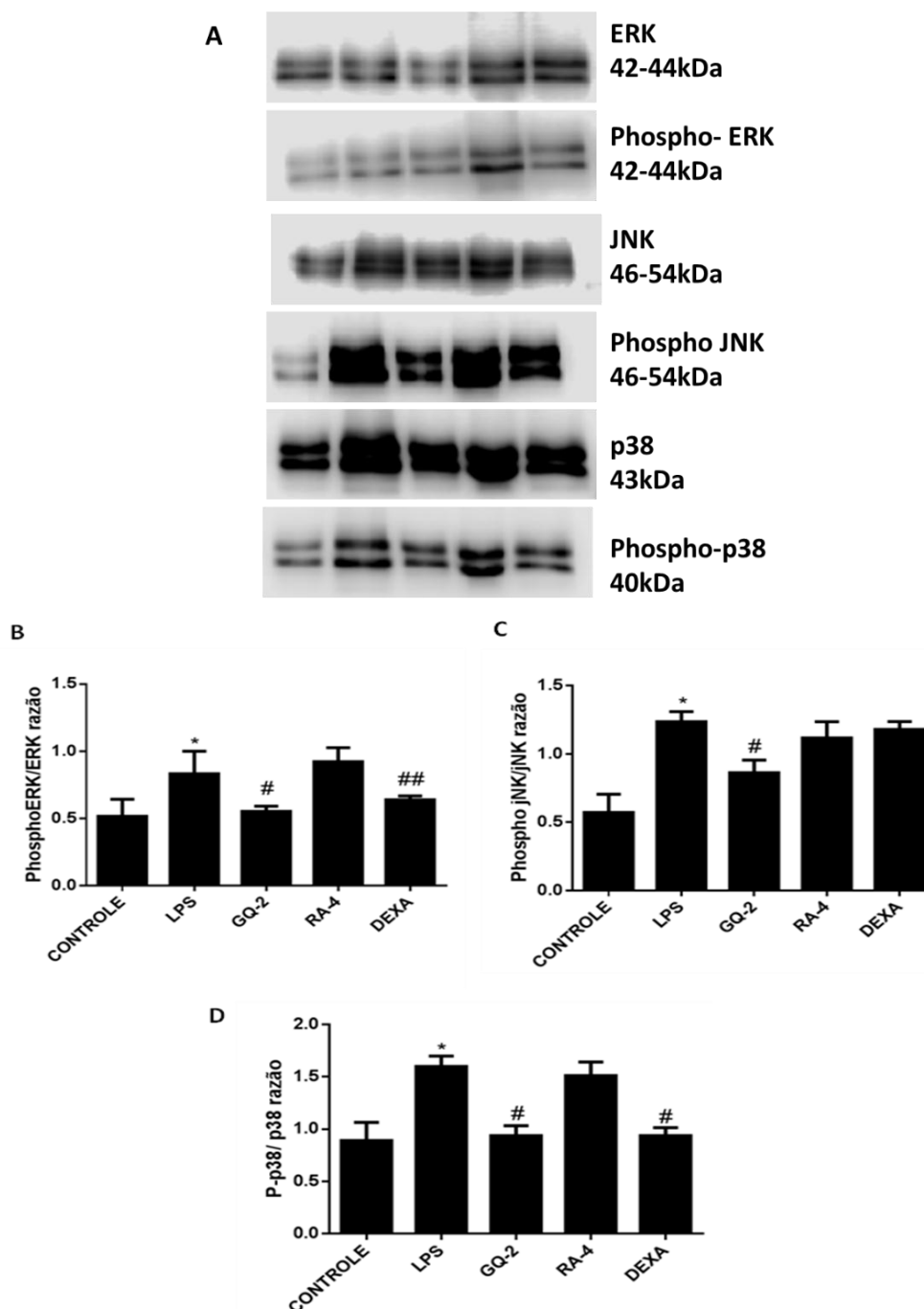
Em oposição ao resultado obtido pela LPSF/RA-4, o grupo LPSF/GQ-2 obteve significativa redução sobre a expressão de todas as MAPKs analisadas (Figura 21). Assim como, LPSF/GQ-2 foi o único tratamento que capaz de inibir expressão da JNK fosforilada (Figura 21, C) trazendo um benefício adicional sobre a dexametasona.

O grupo DEXA apresentou baixos níveis de fosforilação de ERK (Figura 21, A) e p38 (Figura 21, B), porém não obteve efeito protetor frente o aumento de JNK fosforilado (Figura 21, C).

## 6.7 Análise sobre a expressão de PARP-1

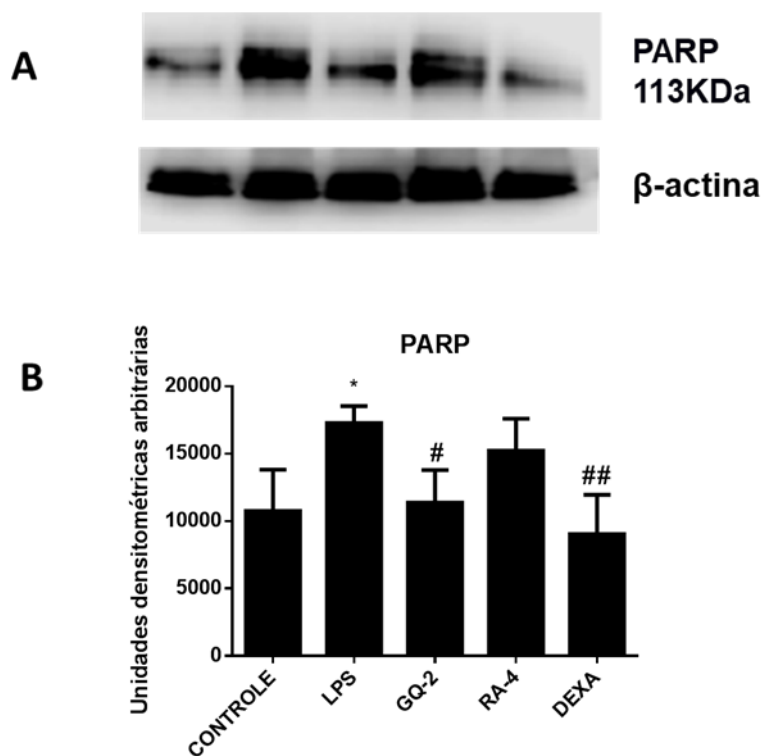
Poly (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) possui um importante papel na inflamação, sinalização de dano e morte celular. Após 24hs da instilação de LPS, os níveis de PARP estavam significativamente aumentados (Figura. 22). Em contraste, LPSF/GQ-2 foi capaz de reduzir significativamente a expressão de PARP, assim como o grupo DEXA. O grupo LPSF/RA-4 não demonstrou efeitos inibitórios sobre as expressões de PARP1.

**Figura 21 – Níveis relativos de expressão das MAPKs fosforiladas**



Fonte: Elaborada pela autora

Legendas: A- Visualização das bandas da imunodeteccção por western blotting. B – quantificação relativa da forma fosforilada p-ERK sobre a não fosforilada ERK. C- quantificação relativa da forma fosforilada da p-JNK sobre a JNK. D- quantificação relativa da forma da p-p38 sobre a p38. Os resultados gráficos foram expressos na forma de razão da fração fosforilada das proteínas sobre a não fosforilada. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos, \* controle versus LPS, # LPS versus grupos.

**Figura 22 - Análise da Expressão de PARP1**

Fonte: Elaborado pela autora

Legendas: A- Visualização da banda de imunodeteção para PARP1 via western blot. B- Gráfico representativo da quantificação da expressão de PARP. Os resultados foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. \* controle versus LPS, # LPS versus grupos.

## 7 DISCUSSÃO

A LPA/SDRA frequentemente observadas em pacientes politraumatizados, possui causas multifatoriais e requer cuidados de terapia intensiva. Apesar de mais de cinquenta anos da primeira descrição da LPA, ainda não existem terapias farmacológicas efetivas para a LPA/SDRA (BAKOWITZ; BRUNS; MCCUNN, 2012). Comumente, são empregados corticosteroides para suprimir o processo inflamatório agudo, porém estudos clínicos relatam que faltam evidências suficientes para assegurar a efetividade dessa classe no controle da LPA/SDRA (MATTHAY; MCAULEY; WARE, 2017). Desta forma, existe uma intensa busca por novos anti-inflamatórios seguros e eficazes.

O modelo murino de LPA induzido por LPS é amplamente utilizado para avaliação de fármacos e reproduz os danos teciduais característicos da LPA (CHEN; BAI; WANG, 2010). Após 24 horas da instilação nasal de LPS, a análise histológica demonstrou que os animais do grupo LPS exibiram dano alveolar difuso (DAD), múltiplos focos de infiltração celular, edema e espessamento alveolar. Esses dados foram quantificados no escore tecidual que representou graficamente maior pontuação no grupo LPS. Em contrapartida, a análise histológica dos pulmões revelou efeitos benéficos sobre o dano tecidual nos grupos tratados com LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4.

Intensa migração celular foi relatada no modelo de LPA no grupo LPS. O MPO é uma enzima abundante nos neutrófilos, seus níveis servem como importante indicador de acúmulo de neutrófilos ativados no espaço alveolar (MATUTE-BELLO et al., 2011). Nossos resultados apontam alto grau de migração celular no LBA, os níveis de MPO também foram significativamente aumentados, permitindo inferir alta concentração de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Os grupos pré-tratados com as TZDs e DEXA obtiveram alto grau de proteção contra a migração celular.

Em paralelo, durante a inflamação o óxido nítrico (NO) constitui uma importante fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo produzido principalmente pela iNOS (VAN DER VLIET; CROSS, 2000). Nos pulmões, os principais tipos celulares que expressam a iNOS são macrófagos alveolares, células epiteliais e células do infiltrado inflamatório (ALESSIO et al.,

2017). O efeito comparativo das novas moléculas sobre a infiltração celular e níveis de MPO e NO foi bastante similar ao fármaco padrão dexametasona (DEXA). Entretanto, LPSF/GQ-2 foi o tratamento que demonstrou melhor grau de proteção frente as alterações teciduais e inibição da produção de NO e iNOS.

A lesão pulmonar aguda (LPA) está geralmente associada com elevações sobre os mediadores pro-inflamatórios, os quais incluem:  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$  (MATUTE-BELLO et al., 2011). Existem evidências que correlacionam a broncoconstrição como uma resposta dependente da estimulação ao  $TNF\alpha$  (TOGBE et al., 2007). Neste modelo, o estímulo ao LPS resultou em expressão aumentada de  $TNF\alpha$ , a qual foi inibida pelo tratamento com LPSF/GQ-2 e DEXA que podem oferecer um fator de proteção adicional contra a broncoconstrição.

Os dados sobre a expressão de  $IL-6$ , principal interleucina envolvida na migração de neutrófilos (MÜLLER et al., 2016), corroboram os achados na contagem celular nos grupos tratados com LPSF/GQ-2, LPSF/RA-4 e DEXA. Em paralelo, a função da  $IL-1\beta$  está associada com o aumento do estresse oxidativo dependente dos neutrófilos (REPINE, 1994). Os dados neste modelo indicam que apenas os animais tratados com LPSF/GQ-2 obtiveram benefício sobre a redução para  $IL-1\beta$ . Nossos resultados confirmam dados de estudos prévios em modelos de aterosclerose e esteatose hepática, em que o pré-tratamento com LPSF/GQ-2 favoreceu a redução de  $IL-6$ , assim como dos parâmetros relacionados a progressão da inflamação (SOARES E SILVA et al., 2016; SOARES E SILVA et al., 2015).

Em relação ao tratamento com LPSF/RA-4, não houve efeito inibitório sobre a expressão de  $IL-1\beta$ . Entretanto, dados obtidos no modelo de pleurisia mostram que LPSF/RA-4 ofereceu proteção sobre a expressão dessa citocina (BARBOSA et al., 2013). Diferenças relacionadas a origem da inflamação entre os modelos de LPA e pleurisia podem ter influenciado nas diferentes respostas apresentadas, além de diferenças a respeito da via de administração, realizada pela via intraperitoneal na pleurisia. Estudos que avaliem o perfil farmacocinético da LPSF/RA-4 podem trazer uma importante contribuição para assegurar melhor biodisponibilidade.

A ativação do NF $\kappa$ B detém um importante papel na LPA/SDRA. A excessiva ativação do NF $\kappa$ B resulta em uma resposta inflamatória aguda nos pulmões em pacientes críticos (NYS et al., 2003). Em geral, o mecanismo clássico de ativação do NF $\kappa$ B envolve a fosforilação da sua proteína inibitória  $I\kappa B\alpha$  por um complexo de quinases (IKKs) (HOESEL; SCHMID, 2013). O LPS induz a ativação do NF $\kappa$ B

através dos receptores do tipo toll (TLRs), principalmente pelo TLR4, o qual estimula duas respostas denominadas dependentes e independentes da proteína adaptadora do fator mieloide 88 (MyD88). Ambas as vias resultam em fosforilação da IKK (KAWAI; AKIRA, 2007). Nossos resultados demonstraram altos níveis de expressão da forma fosforilada de I $\kappa$ B $\alpha$  após 24 horas do estímulo com LPS. Em contraste, o pré-tratamento com LPSF/GQ-2 ofereceu significativa proteção frente a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  e subsequente aumento da resposta pro-inflamatória dependente de NF $\kappa$ B. Similar grau de inibição da via do NF $\kappa$ B para LPSF/GQ-2 também foi observado no modelo de esteatose hepática não alcoólica (SOARES E SILVA et al., 2015).

Estudos mostram que a atividade transcricional do NF $\kappa$ B é aumentada com a fosforilação da p65 (VANDEN BERGHE et al., 1998). Nossos resultados mostraram uma proteção adicional contra a fosforilação da p65 nos grupos previamente tratados com LPSF/GQ-2 e dexametasona. Um dos mecanismos de fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  é através do complexo de quinases IKKs. Os ativadores de IKKs incluem as quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que representam um ponto de convergência a numerosos estímulos, incluindo ligantes para os TLRs (MOYNAGH, 2005).

A p38 MAPK é considerada uma enzima crítica para a produção de TNF $\alpha$ , a ativação da broncoconstrição e processo inflamatório induzido pelo LPS (SCHNYDER-CANDRIAN et al., 2005). Devido a sua importante função, a p38 representa um importante alvo para intervenção da SDRA (SWEENEY; GRIFFITHS; MCAULEY, 2013). Em geral, as quinases JNK e p38 são ativadas por citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , ou em resposta ao estresse celular, genotóxicos, agentes osmóticos, hipóxia ou estresse oxidativo (KIM; CHOI, 2010). Nossos resultados mostram o papel protetor da LPSF/GQ-2 sobre a expressão da p-p38 e inibição da expressão de TNF $\alpha$ . Assim como, a LPSF/GQ-2 foi protetora frente ao aumento da expressão de p38 e JNK induzido pelo LPS, os quais respondem pela produção de TNF $\alpha$  e ROS respectivamente.

A Rosiglitazona, uma TZD comercial utilizada para o tratamento da diabetes, apresentou efeitos protetores sobre a expressão de NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B no modelo de inflamação pulmonar aguda induzido por paraquat (LIU et al., 2013). Assim como, anteriormente já demonstrou eficácia sobre a redução de NO e MPO em um modelo de inflamação aguda induzida por endotoxemia (LIU et al., 2005). Esses estudos indicam elevada eficácia protetora dos agonistas de PPAR $\gamma$  para o controle da



inflamação aguda na LPA/SDRA. No entanto, os efeitos adversos apresentados pelas TZDs comercialmente disponíveis como: ganho de peso, hepatotoxicidade (Troglitazona) e cardiotoxicidade (Rosiglitazona) limitaram seu uso na prática clínica (WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016).

Neste aspecto avanços estão sendo feitos para o desenvolvimento de compostos TZDs mais seguros, eficazes e com menor risco de efeitos adversos. Na LPA/SDRA o potencial anti-inflamatório dos agonistas PPAR $\gamma$  não pode ser descartado (WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016). Recentemente, um estudo demonstrou novos detalhes estruturais para o desenvolvimento de novas TZDs com menor potencial para efeitos adversos (JANG et al., 2018).

Alguns estudos tem relatado que parte dos efeitos indesejáveis devem-se a ativação cruzada de não alvos “off targets”, ou falha na seletividade ao PPAR $\gamma$  (WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016). Outro aspecto relacionado a produção de efeitos indesejáveis tem sido correlacionado a ativação das ERKs, a qual resulta em inativação do PPAR $\gamma$  através da fosforilação, o que prejudica sua atividade transcricional e induz um perfil inflamatório (SMITH et al., 2009).

A Rosiglitazona, Ciglitazona, Troglitazona e Pioglitazona alternativamente ligam-se ao receptor de ácido graxo livre (GPR40) o qual induz a ativação da ERK (WANG; DOUGHERTY; DANNER, 2016). A Rosiglitazona provoca uma ativação mais prolongada de ERK, comparada com a Pioglitazona (SMITH et al., 2009). Esses efeitos podem explicar as diferenças relacionadas a eficácia e segurança entre as TZDs. Em 2010, a Rosiglitazona foi retirada do mercado brasileiro por questões de relacionadas a cardiotoxicidade. No entanto, a Pioglitazona continua no mercado mundial por demonstrar menor risco de efeitos adversos graves.

Nossos dados mostram que a LPSF/GQ-2 foi capaz de inibir a expressão das formas ativas fosforiladas da ERK, p38 e JNK, obtendo um importante efeito anti-inflamatório que se reflete na inibição da expressão de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 observadas neste modelo. Em contraste, a LPSF/RA-4 não ofereceu proteção sobre os níveis de expressão de I $\kappa$ B, NF $\kappa$ B, ERK, p38 e JNK que obtiveram valores muito similares ao grupo LPS. O menor efeito da LPSF/RA-4 pode ser um reflexo da ativação sobre a via da ERK considerada problemática e indutora de perfil inflamatório. O tratamento com dexametasona inibiu consideravelmente a ERK e a p38, promovendo também a inibição da sinalização da via do NF $\kappa$ B, porém não houve benefícios sobre a inibição da expressão da p-JNK. Esses dados mostram um

benefício adicional da LPSF/GQ-2, pois foi o único tratamento capaz de inibir a expressão das formas fosforiladas de todas as MAPKs analisadas.

A PARP-1 possui papel chave na regulação da LPA induzida por LPS em modelos animais, assim como em processos envolvendo aumento do estresse oxidativo (LIAUDET et al., 2002). A excessiva ativação de PARP-1 relaciona-se a morte celular associada a mitocôndria em tecidos lesados e constitui outro mecanismo para exacerbar a inflamação (BA; GARG, 2011). A PARP-1 regula a expressão de citocinas dependentes da ativação de NFκB, moléculas de adesão e iNOS (SETHI; DHARWAL; NAURA, 2017). Estudos conduzidos em macrófagos murinos reportam que a estimulação ao LPS aumenta a ligação de PARP-1 ao NFκB (p65) resultando em ribosilação e aumento da atividade transcricional do NFκB. Também foi reportado que a ativação de ERK possui um importante papel na ativação de PARP-1 (LIU et al., 2012). Outros estudos indicam que PARP-1 está implicado na regulação de p38 e JNK, normalmente associados a morte celular e aumento do estresse oxidativo (RACZ et al., 2010).

Neste estudo, LPSF/GQ-2 reduziu a expressão de PARP, p-p38 e JNK indicando efeito protetor contra a morte celular, porém neste aspecto outros marcadores precisam ser avaliados, utilizando inibidores específicos das MAPKs e marcadores de apoptose com vista a esclarecer o seu mecanismo de ação, assim como seu papel protetor.

## 8. CONCLUSÃO

- As TZDs representam um potencial terapêutico na LPA/SDRA. Nesse estudo, a LPSF/GQ-2 apresentou excelente proteção tecidual frente a infiltração celular de PMNs, NO, citocinas pró-inflamatórias, MAPKs e NFkB;
- A LPSF/RA-4 obteve baixa eficácia frente a inflamação induzida pelo LPS, esse aspecto pode estar relacionado a ativação da ERK que conduz a um perfil inflamatório por inativar o PPAR $\gamma$ . Outro aspecto que poderia explicar a falta de efetividade da LPSF/RA-4 é a biodisponibilidade oral que não foi investigada nesta série de TZDs;
- Adicionalmente, LPSF/GQ-2 também reduziu significativamente a expressão de PARP1 que pode indicar efeito protetor frente a morte celular.
- Os dados obtidos nesse estudo indicam elevado potencial anti-inflamatório para a LPSF/GQ-2 contra modificações teciduais, expressão de citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios da LPA/SDRA.

## REFERÊNCIAS

AKBIYIKET, F. et al. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR $\gamma$ , and PPAR $\gamma$  agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes". **Blood**, New York, v. 104, n. 5, p. 1361–1368, 2004.

ALESSIO, F. R. D. et al. Resolution of Experimental Lung Injury by Monocyte-Derived Inducible Nitric Oxide Synthase. **J. Immunol**, Baltimore, v. 189, n. 5, p. 2234-2245, 2012.

ALM, A. S. et al. Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, Amsterdam, v. 171, n. 2, p. 157–164, 2010.

ALM, A. S. et al. Varying susceptibility of pulmonary cytokine production to lipopolysaccharide in mice. **Cytokine**, Philadelphia, v. 49, n.3, p. 256–263, 2010.

AMATO, M. B. P. et al. Ventilação Mecânica na Lesão Pulmonar Aguda / Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo: III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 374-383, 2007.

ANWAR, M. A; CHOI, S. Gram-negative marine bacteria: Structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases. **Marine Drugs**. Basel, v. 12, n. 5, p. 2485–2514, 2014.

ASADA, K. et al. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. New York, v. 169, n.2, p. 195–200, 2004.

ASHBAUGH, D.G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, London, v. 290, n. 7511, p. 319–323, 1967.

BA, X; GARG, N. J. Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 178, n. 3, p. 946–955, 2011.

BACHOFEN, M; WEIBEL, E. R. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. **Am. Rev. Respir. Dis**, Baltimore, v.116, n. 4, p. 589–615, 1967.

BAKOWITZ, M; BRUNS, B; MCCUNN, M. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in the injured patient. **Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine**, London, v. 20, n. 1, p. 54, 2012.

BANFI, A. et al. Development of bronchus-associated lymphoid tissue hyperplasia following lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. **Exp. Lung Res**, New York, v. 35, n. 3, p. 186–197, 2009.

BARBOSA, K. P. et al. Reduction of carrageenan-induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 718, n.1–3, p.197–205, 2013.

BAUE, A. E; DURHAM, R; FAIST, E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle?. **Shock**, Augusta, v.10, n. 2, p.79–89, 1998.

BECKER, J. et al. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases?. **Fundam Clin Pharmacol**, Paris, v. 20, n. 5, p. 429–447, 2006.

BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 149, n. 3, p. 818–824, 1994.

BERTHIAUME, Y. Epithelial function in lung injury. 1 ed. In: Hamid, Q; Shannon, J; Martin, J. **Physiologic Basis of Respiratory Disease**. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc, 2005. v.1, p. 439-452.

BILBAN, M. et al. Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPAR $\gamma$ . **Immunity**, Cambridge, v. 24, n. 5, p. 601–610, 2006.

BLOT, M. et al. Do we know enough to recommend corticosteroids in acute respiratory distress syndrome?. **Critical Care**, London, v. 21, n. 1, p. 327, 2017.

BOUHLEL, M. A. et al. Unlike PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  or PPAR $\beta/\delta$  activation does not promote human monocyte differentiation toward alternative macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 386, n. 3, p. 459–462, 2009.

BRADLEY, P. P; CHRISTENSEN, R. D; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, New York, v. 60, p. 618–622. 1982.

BRIELAND, J. K; KUNKEL, R. G; FANTONE, J. C. Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. **Am. Rev. Respir. Dis**, Baltimore, v. 135, n. 6, p. 1300–1306, 1987.

CAKAROVA, L. et al. Macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  induces epithelial expression of granulocyte–macrophage colonystimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, New York, v. 180, n. 6, p. 521–532, 2009.

CELINSKI, K. et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Krakow, v. 62, n. 3, p. 347–356, 2011.

CHEN, H; BAI, C; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine . **Expert Rev Respir Med**, London, v. 4, n. 6, p. 773–783, 2010.

CHEN, B. C; LIN, W. W. PKC- and ERK-dependent activation of I $\kappa$ B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. **Br J Pharmacol**, London, v. 134, n. 5, p. 1055–1065, 2001.

CHENG, D. S; HAN, W; CHEN, S. M. et al. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF $\kappa$ B pathway. **J. Immunol**, Baltimore, v. 178, n. 10, p. 6504–6513, 2007.

CHEUNG, Y. O; GRAZIANO, P; SMITH, M. L. Acute Lung Injury. In: LESLIE, K. O; WICK, M. R. **Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2018. Cap. 6. p. 125-146.

CROASDELL, A. et al. PPAR $\gamma$  and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. **PPAR Research**, New York, v. 2015, p.1-20, 2015. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/ppar/2015/549691/cta/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

CUZZOCREA, S. et al. Rosiglitazone and 15-deoxy- $\Delta$  12,14-prostaglandin J 2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 140, n. 2, p. 366–376, 2003.

DELERIVE, P; FRUCHART, J. C; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. **J. Endocrinol**, Bristol, v. 169, n. 3, p. 453–459, 2001.

DELERIVE, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor a negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF $\kappa$ B and AP-1. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v. 274, n. 45, p. 32048–32054, 1999.

DESVERGNE, B; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr. Rev.**, Chevy Chase, v. 20, n. 5, p. 649–688, 1999.

DUSHIANTHAN, A. et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. **Postgrad Med J**, London, v. 87, n. 1031, p. 612-622, 2011.

ESTEBAN, A. et al. Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 177, p. 170–177, 2008.

ESTENSSORO, E. et al. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Med.**, New York, v. 30, n. 11, p. 2450-2456, 2002.

- EVERHART, M. B. et al. Duration and intensity of NFkB activity determine the severity of endotoxin-induced acute lung injury. **J. Immunol**, Baltimore, v. 176, n. 8, p. 4995–5005, 2006.
- FENG, Y. et al. Effects of HMGB1 on PMN apoptosis during LPS-induced acute lung injury. **Exp. Mol. Pathol**, New York, v. 85, n. 3, p. 214–222, 2008.
- FERRING, M; VINCENT, J. L. Is outcome from SDRA related to the severity of respiratory failure?. **Eur. Respir. J.**, Copenhagen, v.10, n. 6, p. 1297-300, 1997.
- FOLKESSON, H. G. et al. Acid aspiration–induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. **J. Clin. Investig.**, New Haven, v. 96, n. 1, p. 107–16, 1995.
- FOWLER, R. A. et al. Sex and critical illness. **Curr Opin Crit Care**, Philadelphia, v.15, n. 5, p. 442–449, 2009.
- GALHARDO, F. P. L; MARTINEZ, J. A. B. Síndrome do desconforto respiratório agudo. **Medicina**, Ribeirao Preto, v. 36, n. 2/4, p. 248-256, 2003.
- GAO, M. et al. Protective effect of pioglitazone on sepsis-induced intestinal injury in a rodent model. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 195, n. 2, p. 550–558, 2015.
- GARBER, B. G. et al. Adult respiratory distress syndrome: a systemic overview of incidence and risk factors. **Crit. Care Med.**, New York, v. 24, n. 4, p. 687-95, 1996.
- GATTINONI, L. et al. Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. **JAMA**, Chicago, v. 271, n. 22, p. 1772-1779, 1994.
- GHOSH, S; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 11, p. 837–848, 2008.
- GILMORE, T. D. Introduction to NF-kappa B: Players, pathways, perspectives. **Oncogene**, Basingstoke, v. 25, n. 51, p. 6680-6684, 2006.
- GROMMES, J; MÖRGELIN, M; SOEHNLEIN, O. Pioglitazone attenuates endotoxin-induced acute lung injury by reducing neutrophil recruitment. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 416–423, 2012.
- GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 236–242, 2010.
- GUHA, M; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cell Signal**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 85-94, 2001.
- HITTI. E; KOTLYAROV. A. The ERK and p38MAPK Pathways as Targets for Anti-Inflammatory Therapy. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 6, n.1, p. 85-97, 2007.

HOESEL, B; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular cancer**, London, v. 12, n. 1, p. 86, 2013. Disponível em: <<https://molecular-cancer.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1476-4598-12-86>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

HOMMES, D. W; PEPPELENBOSCH, M. P; VAN DEVENTER, S. J. H. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. **Gut**, London, v. 52, n. 1, p. 144–51, 2003.

IRIE, T; MUTA, T; TAKESHIGE, K. TAK 1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in Lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 467, n. 2-3, p. 160-164, 2000.

JAIN, M. et al. Leptin promotes fibroproliferative acute respiratory distress syndrome by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 183, n. 11, p. 1490–1498, 2011.

JAIN, S; BELLINGAN, G. Basic science of acute lung injury. **Surgery**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 112-116, 2007;

JANG, J. Y. et al. Structural Basis for the Enhanced Anti-Diabetic Efficacy of Lobeglitazone on PPAR $\gamma$ . **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 31, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5758645/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

JEONG, T. S. et al. Inhibitory Effects Of Multi-Substituted Benzylidenethiazolidine-2,4-Diones on LDL Oxidation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, n. 15, p. 4017-4023, 2004.

JOHNSON, E. R; MATTHAY, M. A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, Rochelle, v. 23, n. 4, p. 243–52, 2010.

KARIMA, R. et al. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Mol Med Today**, Cambridge, v. 5, n. 3, p. 123–132. 1999.

KAWAI et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. **J Immunol**, Baltimore, v.167, n.10, p. 5887-5894, 2001.

KAWAI, T; AKIRA, S. Signaling to NF-KappaB by toll-like receptors. **Trend in molecular medicines**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 460-469, 2007.

KIM, H. J. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF $\kappa$ B activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages. **Toxicology**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 36–47, 2006.



KIM, E. K; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1802, n. 4, p. 396–405, 2010.

KIM, K. Y; LEE, H. S; SEOL, G. H. Eucalyptol suppresses matrix metalloproteinase-9 expression through an extracellular signal-regulated kinase-dependent nuclear factor-kappa B pathway to exert anti-inflammatory effects in an acute lung inflammation model. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 67, n. 8, p. 1066-1074, 2015.

KONOPLEVA, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 3, n. 10, p. 1249–1262, 2004.

KULKARNI, A. A. et al. Emerging PPAR $\gamma$ -independent role of PPAR $\gamma$  ligands in lung diseases. **PPAR Research**, New York, v. 2012, p705352. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/705352>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

LAFFEY, J. G. et al. Potentially modifiable factors contributing to outcome from acute respiratory distress syndrome: the LUNG SAFE study. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 42, n. 12, p. 1865–1876, 2016.

LI, H. et al. Repair of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by endothelial progenitor cells, alone and in combination with simvastatin. **Chest**, Chicago, v. 144, n. 3, p. 876-886, 2013.

LI, Q; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, n. 10, p. 725-734, 2002.

LIEN, E. et al. Toll-like receptors 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 105, n. 4, p. 497-504, 2000.

LIU, G. et al. High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 181, n. 6, p. 4240–4246, 2008.

LOONEY, M. R. et al. Neutrophils and their Fc $\gamma$  receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. **J. Clin. Investig.**, New Haven, v. 116, n. 6, p. 1615–1623, 2006.

MA, Z. et al. Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression. **Inflammation**, New York, v. 36, n. 6, p. 1560-1566, 2013.

MANCINI, A. D; POITOUT, V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: How much do we know? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 24, n. 8, p. 398–407, 2013.

MATTHAY, M. A. Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 189, n. 11, p. 1301–1308, 2014.

MATTHAY, M. A; MCAULEY, D. F; WARE, L. B. Clinical trials in acute respiratory distress syndrome: challenges and opportunities. **The Lancet Respiratory Medicine**, Kidlington, v. 5, n. 6, p. 524–534, 2017.

MATTHAY, M. A; ZEMANS, R. L. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. **Annu Rev Pathol**, Palo Alto, v. 6, n. 1, p. 147–163, 2011.

MATUTE-BELLO, G; FREVERT, C. W; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol**, Bethesda, v. 295, n. 3, p. 379–399, 2008.

MATUTE-BELLO, G. et al. An official american thoracic society workshop report: Features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 44, n. 5, p. 725–738, 2011.

MAZZOLA, S. et al. Carbon monoxide pretreatment prevents respiratory derangement and ameliorates hyperacute endotoxic shock in pigs. **FASEB J**, Bethesda, v. 19, n. 14, p. 2045–2047, 2005.

MEDURI, G. U. et al. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 829–840, 2016.

MIOTLA, J. M. et al. A role for the b2 integrin CD11b in mediating experimental lung injury in mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol**, New York, v. 14, n. 4, p. 363–373, 1996.

MIRZAPOIAZOVA, T. et al. Suppression of endotoxin-induced inflammation by taxol. **Eur. Respir. J.**, Copenhagen, v. 30, n. 3, p. 429–435, 2007.

MOINE, P. et al. NF- $\kappa$ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. **Shock**, Augusta, v.13, n. 2, p. 85–91, 2000.

MOSHAGE, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clin Chem**, Baltimore, v. 41, p. 892–896, 1995.

]

MOSS, M. et al. Diabetic patients have a decreased incidence of acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, New York, v. 28, n. 7, p. 2187–2192, 2000.

MOYNAGH, P. N. The NF-kappaB pathway. **J. Cell. Sci**, London, v. 118, n. 20, p. 4589–4592, 2005.

MOURÃO, R. H. V. **Síntese, Modelagem Molecular e Atividade Hipoglicemiante de Novas Arilideno-Tiazolidinedionas**. 2006. 95 f. Tese (doutorado) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MULLER, G. et al. Effects of various applications of lipopolysaccharides on blood parameters of pigs. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Berlin, v. 49, n. 9, p. 429-437, 2002.

MURRAY, J. F. et al. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. **American Review of Respiratory Disease**, Baltimore, v. 138, n. 3, p. 720-723, 1988.

NAIM, M. J. et al. Therapeutic journey of 2,4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: An insight into structure activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 129, n. 1, p. 218-250, 2017.

NATHENS, A. B. et al. Thiol-mediated regulation of ICAM-1 expression in endotoxin-induced acute lung injury. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 160, n. 6, p. 2959–2966, 1998.

NYS, M. et al. Bronchoalveolar lavage fluids of ventilated patients with acute lung injury activate NF- $\kappa$ B in alveolar epithelial cell line: Role of reactive oxygen/nitrogen species and cytokines. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 9, n. 1, p. 33–43, 2003.

OECKINGHAUS, A; HAYDEN, M. S; GHOSH, S. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Nat Immunol**, New York, v. 12, n. 8, p. 695–708, 2011.

OSHIKAWA, K; SUGIYAMA, Y. Gene expression of Toll-like receptors and associated molecules induced by inflammatory stimuli in the primary alveolar macrophage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 305, n. 3, p. 649–655, 2003.

PADILLA, J; LEUNG, E; PHIPPS, R. P. Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR $\gamma$  and are killed by PPAR- $\gamma$  agonists. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 103, n. 1, p. 22–33, 2002.

PATEL, H. J. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 170, p. 2663–2669, 2003.

PENAS, F. et al. Treatment in vitro with PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from *T. cruzi*-infected mice. **Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1852, n. 5, p. 893–904, 2015.

PEREIRA, D. T. M. **Síntese, Caracterização Estrutural e Avaliação da Atividade Anti-inflamatória de Derivados Tiazolidínicos e Imidazolidínicos**. 2003. Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos - Departamentos de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PETTY, J. M. et al. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 178, n. 12, p. 8148–8157, 2007.

RAGHAVENDRAN, K. et al. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Curr Med Chem**, Schiphol, v. 15, n. 19, p. 1911–1924, 2008.

RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA**, Chicago, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 2012.

REDDY, A.T; LAKSHMI, S. P; REDDY, R. C. Murine Model of Allergen Induced Asthma. **J. Vis. Exp.**, Boston, v. 63, p. e3771, 2012. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3791/3771>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

REDDY, R. C. Immunomodulatory role of PPAR-gamma in alveolar macrophages. **Journal of Investigative Medicine**, Thorofare, v. 56, n. 2, p. 522–527, 2008.

REPINE, J. E. Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 102, n. 10, p. 75–78, 1994.

REUTERSHAN, J. et al. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 116, n. 3, p. 695–702, 2006.

REUTERSHAN, J. et al. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, Bethesda, v. 289, n. 5, p. L807–L815, 2005.

RIZZO, G; FIORUCCI, S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 421–427, 2006.

RUAN, S. Y. et al. Exploring the heterogeneity of effects of corticosteroids on acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Critical Care**, London, v. 18, n. 2, p. R63, 2014.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 353, n. 16, p. 1685–1693, 2005.

SANDHU, M. S. et al. The use of the peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  agonist rosiglitazone to treat airway hyperreactivity. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, McLean, v. 109, n. 1, p. 75–77, 2012.

SANTOS, L. A. M. et al. Diethylcarbamazine inhibits NF- $\kappa$ B activation in acute lung injury induced by carrageenan in mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, 2014.

SANTOS, L. C. et al. Synthesis And Anti-inflammatory Activity of New Thiazolidine-2,4-Diones, 4-Thioxothiazolidinones And 2-Thioxoimidazolidinones. **Heterocyclic Communications**, London, v. 11, n. 2, p. 121–128, 2005.

SCHNYDER-CANDRIAN, S. et al. Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. **J Immunol.**, Baltimore, v. 175, n. 1, p. 262-269, 2005.

SHERWOOD, E. R; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, Netherlands, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SOARES E SILVA, A. K. et al. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice LDLR(-/-). **Cardiovasc Pathol.**, New York, v. 22, n. 1, p. 81–90, 2013.

SOARES E SILVA, A. K. et al. Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and atherosclerosis development in LDLr-/-mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 791, p. 622–631, 2016.

SOARES E SILVA, A. K. et al. LPSF/GQ-02 Inhibits the Development of Hepatic Steatosis and Inflammation in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0123787, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123787>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SMITH, N. J. et al. The action and mode of binding of thiazolidinedione ligands at free fatty acid receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 26, p. 17527–17539, 2009.

SU, Z. et al. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 371–378, 2014.

SWEENEY, R. M; GRIFFITHS, M; MCAULEY, D. Treatment of Acute Lung Injury : Current and Emerging Pharmacological Therapies. **Semin Respir Crit Care Med**, New York, v. 1, n. 212, p. 1–10, 2013.

SZARKA, R. J. et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.

TOGBE, D. et al. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 88, n. 6, p. 387–391, 2007.

TOMASHEFSKI, J. F. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clin. Chest Med**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 435–466, 2000.

UCHIBA, M. et al. Endotoxin-induced pulmonary vascular injury is mainly mediated by activated neutrophils in rats. **Thromb. Res.**, Elmsford, v. 78, n. 2, p. 117–125, 1995.

UCHÔA, F. D. T. **Síntese e Avaliação da Atividade Antiinflamatória de 5-Benzilideno-3-(4-Clorobenzil)-Tiazolidina-2,4-Dionas**. 2004. Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos - Departamentos de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

VAN DER VLIET, A; CROSS, C. E. Oxidants, nitrosants, and the lung. **American Journal of Medicine**, New York, v. 109, n. 5, p. 398–421, 2000.

VAN HELDEN, H. P. et al. Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat: a comprehensive animal model to study adult (acute) respiratory distress syndrome. **Exp. Lung Res.**, London, v. 23, n. 4, p. 297–316, 1997.

VANDEN BERGHE, W. et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, p. 3285-3290, 1998.

VILLAR, J. et al. The ALIEN study: Incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 37, n. 12, p. 1932–1941, 2011.

WANG, C. et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, London, v. 412, n. 6844, p. 346-351, 2001.

WANG, X. et al. Airway epithelial dysfunction in the development of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Expert Rev. Respir. Med.**, London, v. 1, n. 1, p. 149–155, 2007.

WANG, G. et al. Activation of PPAR $\gamma$  attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibition of HMGB1-RAGE levels. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 726, n. 1, p. 27–32, 2014.

WANG, S; DOUGHERTY, E. J; DANNER, R. L. PPAR gamma signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. **Pharmacological Research**, London, v. 111, p. 76–85, 2016.

WARE, L. B; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1334-1349, 2000.

WEISER, M. R. et al. Experimental murine acid aspiration injury is mediated by neutrophils and the alternative complement pathway. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v. 83, n. 4, p. 1090–1095, 1997.

WEST, A. P. et al. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, v. 22, p. 409-437, 2006.

WORTHEN, G. S. et al. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury: synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. **The American Review of Respiratory Disease**, Baltimore, v. 136, p. 19–28, 1987.

YAMAMOTO, Y; GAYNOR, R. B. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. **Trends Biochem Sci**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 72-79. 2004.

ZARBOCK, A. et al. Improved survival and reduced vascular permeability by eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase in mouse models of acute lung injury (ALI). **J. Immunol**, Baltimore, v. 183, n. 7, p. 4715–4722, 2009.

ZELLWEGER, R. et al. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. **Crit. Care Med**, New York, v. 25, n. 1, p. 106–110, 1997;

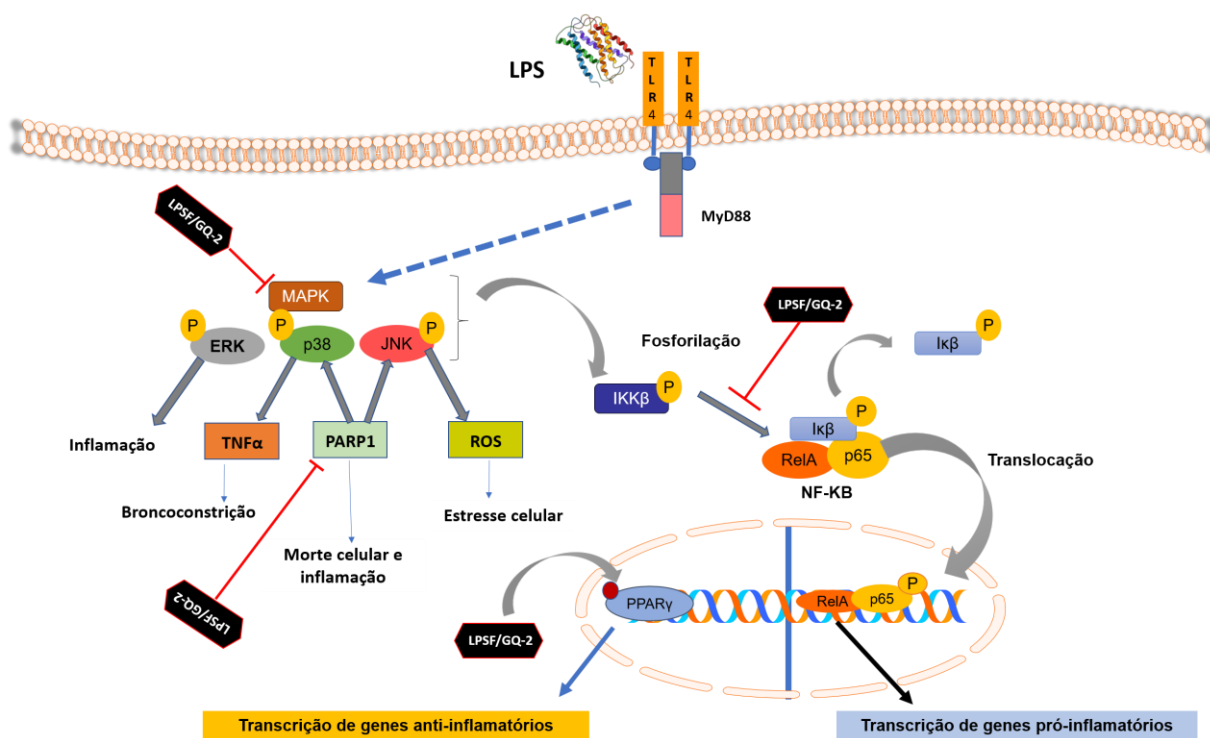
ZHANG, Q. et al. PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic spinal cord injury via anti-inflammatory in adult rats. **Neurological Research**, New York, v. 32, n. 8, p. 852–859, 2010.

ZHANG, X; YOUNG, H. A. PPAR and immune system—what do we know?. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 2, n. 8, p. 1029-1044, 2002.

ZHAO, X. et al. Alterations of adhesion molecule expression and inflammatory mediators in acute lung injury induced by septic and non-septic challenges. **Lung**, Heidelberg, v. 183, n. 2, p. 87–100, 2005.

ZINGARELLI, B. et al. Peroxisome proliferator activator receptor- $\gamma$  ligands, 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathway. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, n. 12, p. 6827–6837, 2003.

## APÊNDICE A- Resumo gráfico





## APÊNDICE B – Artigos publicados no doutorado (autoria principal)

International Immunopharmacology 57 (2018) 91–101



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](http://www.elsevier.com/locate/intimp)



### New thiazolidinedione LPSF/GQ-2 inhibits NFκB and MAPK activation in LPS-induced acute lung inflammation



Laise Aline Martins dos Santos<sup>a,b</sup>, Gabriel Barros Rodrigues<sup>c</sup>, Fernanda Virgínia Barreto Mota<sup>c</sup>, Maria Eduarda Rocha de França<sup>c</sup>, Karla Patrícia de Souza Barbosa<sup>e</sup>, Wilma Helena de Oliveira<sup>c</sup>, Sura Wanessa Santos Rocha<sup>f</sup>, Deniele Bezerra Lós<sup>d</sup>, Amanda Karolina Soares Silva<sup>c</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva<sup>c</sup>, Christina Alves Peixoto<sup>a,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Biosciences and Biotechnology for Health (PPGBBS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-PE)/Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Biotechnology/RENORBIO, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>e</sup> Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>f</sup> State University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>g</sup> Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Acute lung injury  
Thiazolidinediones (TZDs)  
NFκB  
MAPKs

#### ABSTRACT

Acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) are responsible for high mortality rates in critical patients. Despite > 50 years of intensive research, there is no pharmacologically effective treatment to treat ALI. PPARs agonists, chemically named thiazolidinediones (TZDs) have emerged as potential drugs for the treatment of ALI and ARDS due to their anti-inflammatory efficacy. The present study aims to evaluate the potential anti-inflammatory effects of new TZDs derivatives, LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4, on ALI induced by LPS. BALB/c mice were divided into five groups: 1) Control; 2) LPS intranasal 25 µg; 3) LPSF/GQ-2 30 mg/kg + LPS; 4) LPSF/RA-4 20 mg/kg + LPS; and 5) DEXA 1 mg/Kg + LPS. BALF analyses revealed that LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 reduced NO levels in BALF and inflammatory cell infiltration induced by LPS. MPO levels were also reduced by the LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 pre-treatments. In contrast, histopathological analyses showed better tissue protection with LPSF/GQ-2 than DEXA and LPSF/RA-4 groups. Similarly, LPSF/GQ-2 reduced inflammatory markers (IL-1, iNOS, TNFα, IL-1β, IL-6) better than LPSF/RA-4. The LPSF/GQ-2 anti-inflammatory action could be attributed to the inhibition of NFκB, ERK, p38, and PARP pathways. In contrast, LPSF/RA-4 had no effect on the expression of p38, JNK, NFκB. The present study indicates that LPSF/GQ-2 presents a potential therapeutic role as an anti-inflammatory drug for ALI.

#### 1. Introduction

Acute lung injury (ALI) and its severe form, acute respiratory distress syndrome (ARDS), are considered important causes of death in critical patients. Epidemiological studies estimate that ALI/ARDS is associated with hospital mortality ranging from 30 to 60% [1–3].

The first description of ALI/ARDS was made in 1967 by ASHBAUGH and collaborators [4]. In general, ALI/ARDS is defined by acute-onset tachypnea, hypoxemia, diffuse pulmonary infiltrates, and loss of lung compliance, and characterized by high short-term mortality in adults. The heterogeneous nature of ALI/ARDS and the presence of additional

risk factors makes difficult to assess its molecular basis [5].

Lipopolysaccharide (LPS) is an important agent used to induce ALI/ARDS in animals models due to its relation with sepsis [6,7]. LPS is a principal component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, and an important inductor agent to elicit inflammatory responses, shock, and death [6]. In monocytes, the activation of Toll-Like Receptors (TLR4) by LPS, activates transcription factors like NFκB and AP-1 [8].

The NFκB pathway regulates the expression of several inflammatory mediators such as cytokines, chemokines, adhesion molecules, COX-2 and iNOS [9]. The excessive activation of NFκB is associated with the

\* Corresponding author at: Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Postal Code: 50.670-420, Brazil.

E-mail address: [cpeixoto@cpqam.fiocruz.br](mailto:cpeixoto@cpqam.fiocruz.br) (C.A. Peixoto).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.011>

Received 11 September 2017; Received in revised form 26 January 2018; Accepted 14 February 2018  
1567-5769/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

severity of respiratory dysfunction in patients with ALI/ARDS [10]. Classically, the activation of the NF $\kappa$ B pathway depends on its inhibitory protein degradation (I $\kappa$ B) by a mechanism that involves phosphorylation by IKKs and polyubiquitination [11]. The IKK activators englobe MAPKs and represent a convergence point for numerous stimuli, like the TLRs, IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF $\alpha$ , and cell B and T receptors [11].

Since the inflammatory process is a key role in the development of ALI and contributes to the dysfunction of the airways and tissue remodeling [12], new therapeutic agents are being investigated to treat ALI. PPARs agonists have emerged as potential drugs due to their anti-inflammatory efficacy on T cell regulation, macrophages differentiation, dendritic cells, airway smooth muscle cells, and cytokines expression [13,14].

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor (NR) superfamily that have evolved to become the biological sensors of an lipid metabolism, in particular, the intracellular fatty acid levels [15]. Currently, PPAR $\alpha$  agonists (fibrates) are clinically used for treating dyslipidemia, and PPAR $\gamma$  agonists (thiazolidinediones – TZDs) are used for treating type 2 diabetes mellitus [16,17].

Recently, two new thiazolidinediones (TZDs) compounds, LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4, showed anti-inflammatory activity in models of pleurisy and atherosclerosis, respectively [18,19]. However, no studies have yet evaluated the effect of these molecules on LPS-induced ALI. The present study aims to evaluate the mechanisms of action of LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 on LPS-induced ALI.

## 2. Methods

### 2.1. Synthesis of thiazolidines derivatives — LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4

LPSF/GQ-02 represents the compounds 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione and LPSF/RA-4 represents the structure of 5,3-Benzyl-5-(1H-Indol-3-Metileno)- thiazolidine-2,4-dione. See the chemical structure in Fig. 1A. All the compounds were synthesized and purified at the Department of Antibiotics of the Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) following the methodology described by Mouro et al. [20].

### 2.2. Reagents and antibodies

All the chemicals and reagents used were of analytical grade. LPS (*Escherichia coli* serotype, 0111-B4) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dexamethasone was obtained from Aché (Guarulhos, SP, Brazil). The antibodies were obtained from: anti-IL-1 $\beta$  (GenWay, USA); anti-iNOS (BD Biosciences, USA); anti-TNF $\alpha$  (Abcam, USA); anti-IL6 (Abcam, USA); anti-NF $\kappa$ B (SCBT, USA); anti-Phospho NF $\kappa$ B (Abcam, USA); anti-I $\kappa$ B (SCBT, USA); anti-Phospho I $\kappa$ B (Abcam, USA); anti-p38 (SCBT, USA); anti-phospho p38(SCBT, USA) anti-JNK (SCBT, USA); anti-Phospho JNK (SCBT, USA); anti-ERK(SCBT, USA);

anti-PhosphoERK(SCBT, USA); and anti-PARP (Abcam, USA).

### 2.3. Animals

Male adult BALB/c mice, weighing 25–35 g, were obtained from the Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz (Brazil). The animals were kept at an environmentally controlled room temperature ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) in a light/dark cycle of 12 h, with free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation, protocol n° 101/2016 (CEUA/FIOCRUZ/IAM).

### 2.4. Experimental design

The mice were randomly divided into five groups ( $N = 10$ ) as described below:

- I. CONTROL: Mice received water for injection (100  $\mu\text{L}$ ) + 30  $\mu\text{L}$  Tween20 by oral gavage. After 1 h, they received 0.9% NaCl (25  $\mu\text{L}$ ) by the intranasal route.
- II. LPS: Mice received water for injection (100  $\mu\text{L}$ ) + 30  $\mu\text{L}$  Tween 20 by oral gavage. After 1 h, they received 25  $\mu\text{L}$  of LPS (1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ ) by the intranasal route.
- III. LPSF/GQ-2: Mice received pre-treatment with LPSF/GQ-2 (30 mg/kg) dissolved in water (100  $\mu\text{L}$ ) + 30  $\mu\text{L}$  Tween 20 by oral gavage. After 1 h, they received 25  $\mu\text{L}$  of LPS (1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ ) by the intranasal route.
- IV. LPSF/RA-4: Mice received pre-treatment with LPSF/RA-4 (20 mg/kg) dissolved in water (100  $\mu\text{L}$ ) + 30  $\mu\text{L}$  tween 20 by oral gavage. After 1 h, they received 25  $\mu\text{L}$  of LPS (1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ ) by the intranasal route.
- V. DEXA: Mice received pre-treatment with dexamethasone sodium phosphate, (1 mg/kg) dissolved in water 100  $\mu\text{L}$ ) + 30  $\mu\text{L}$  Tween 20 by oral gavage. After 1 h, they received 25  $\mu\text{L}$  of LPS (1  $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ ) by the intranasal route.

The selection of the dosages of LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 was based on previous studies, which evaluated the best dose and efficacy of these molecules in inflammation models [18,19].

### 2.5. Acute lung inflammation protocol

Mice were anesthetized intraperitoneally with a combination of 10% ketamine hydrochloride (115 mg/kg) and xylazine 2% (10 mg/kg). After confirming analgesia, 25  $\mu\text{g}$  of LPS was dissolved in 25  $\mu\text{L}$  (0.9% NaCl) and instilled intranasally (i.n.) to induce lung injury. After 24 h, mice were euthanized, lung tissues and BALF were collected for the subsequent experiments. Fig. 2A shows the experimental design.

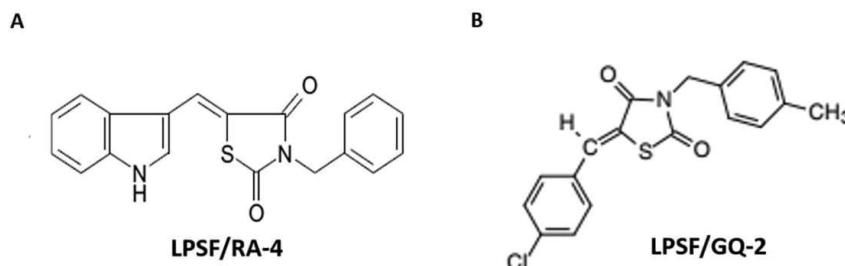
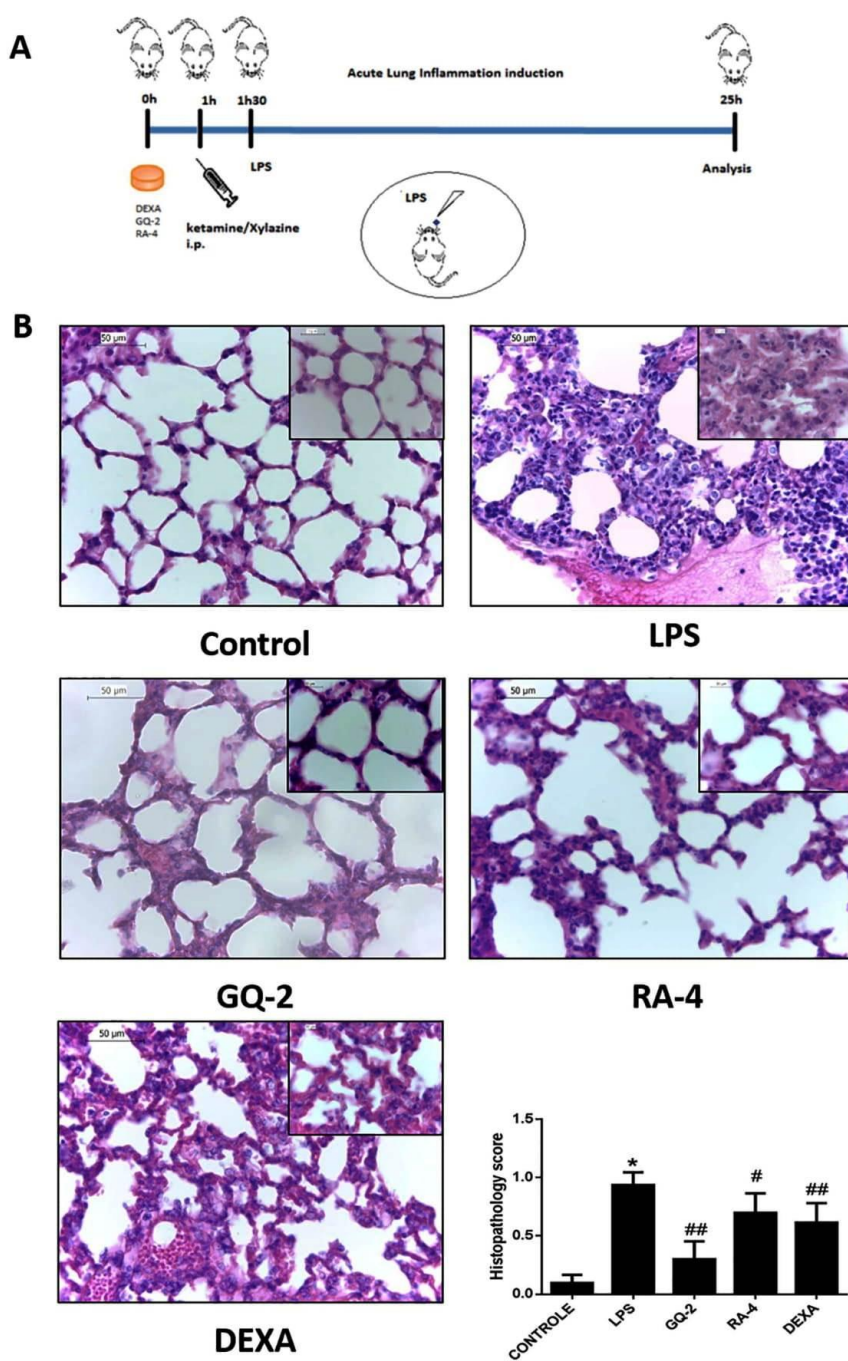


Fig. 1. The molecular structure of the new thiazolidine derivatives LPSF/RA-4 and LPSF/GQ-2.



**Fig. 2.** A – Experimental design scheme. B – Histological analysis of the lungs after LPS induction, Scale bar = 50 µm. C – Histopathology score shows significant inhibition of structural changes induced by LPS. Different pictures of five different animals per group were used for score analyse (N = 5). Control versus LPS \* $P < 0.05$ ; LPS versus groups # $P < 0.01$ ; ## $P < 0.001$ .

## 2.6. BALF and cell count

Mice were euthanized under anesthesia by pentobarbital. The trachea was cannulated and the chest was opened. Ice cold saline (1 ml) was introduced into the trachea three times to recover the bronchoalveolar lavage fluids (BALF). The total BALF cell number was counted in a Hematology Auto Analyzer (ABX Pentra 60, Japan).

## 2.7. NO assay

A sample of the BALF was also withdrawn for NO assay. The total nitrite concentration in the BALF was measured as previously described [21]. The Griess colorimetric reaction was used to measure nitric oxide, involving the detection of nitrite ( $\text{NO}^{2-}$ ) by the oxidation of NO in BALF. In duplicate, 50  $\mu\text{L}$  of the BALF was added to a 96-well ELISA plate, followed by the same volume of the Griess reagent, which was composed of 1% sulphanilamide diluted in 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (solution A) and N-1-naphthyl-ethylenediamine, also diluted in 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (solution B). To prepare the standard curve, a solution of sodium nitrite in an initial concentration of 100  $\mu\text{M}$  was serially diluted in PBS. After incubation for 10 min in the dark, a reading was performed by the spectrophotometer at 490 nm. The absorbance of the different samples was compared with the standard curve, and the results were expressed as a mean  $\pm$  standard deviation of the duplicate, using the GraphPad Prism program (v. 5.0).

## 2.8. MPO assay

Lung tissues were obtained and weighed. Each piece was homogenized in a solution containing 0.5% (w/v) Hexadecyltrimethylammonium bromide, then dissolved in a 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), and centrifuged for 30 min at 4 °C (20,000g). An aliquot of the supernatant was then allowed to react with a solution of 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (1.6 mM) and 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The rate of change in the absorbance was measured spectrophotometrically at 450 nm. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

## 2.9. Tissue analysis and score

Lung biopsies were taken 24 h after the LPS stimulation. Lung fragments were washed twice in PBS (pH 7.2) and fixed in Bouin's solution (1% saturated picric acid, formaldehyde, and 40% glacial acetic acid) for 8 h. Following which, they were dehydrated in an increasing ethanol series, cleared in xylene, and then embedded and included in purified paraffin (VETEC, São Paulo, SP, Brazil). Tissue sections of 5  $\mu\text{m}$  were obtained using a microtome (Leica RM 2125 RT) and deparaffinized with xylene. Then, the slides were stained with hematoxylin/eosin and studied using a light microscopy. The histology score was performed as described [22].

## 2.10. Immunostaining for iNOS and IL-1 $\beta$

Five sections were cut from each group ( $n = 5$ ) and adhered to slides treated with 3-amino-propyl-trietoxi-silane (APES, Sigma, USA). Briefly, the sections were deparaffinized with xylene and rehydrated in graded ethanol (100 to 70%). To minimize endogenous peroxidase activity, the slides were treated with 10% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in water for 15 min. The sections were washed with a 0.01 M PBS (pH 7.2) and then blocked with 1% BSA, 0.2% Tween 20 in PBS for 1 h at room temperature. The sections were incubated overnight at 4 °C with anti-iNOS antibody (ABCAM, CA, USA, 1:250) and anti-IL1 $\beta$  (GenWay, 1:100). The antigen-antibody reaction was visualized with avidin-biotin peroxidase (Dako Universal LSAB<sup>+</sup> + Kit, Peroxidase), using 3,3-Diaminobenzidine as the chromogen. The slides were counterstained with hematoxylin. Positive staining resulted in a brown reaction

product. Quantification the density of pixels was performed in one picture per animal, totalizing 5 pictures by group ( $n = 5$ ). Images of the same magnification were quantitatively analyzed using Gimp 2.6 software (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms).

## 2.11. Western blot for IL-1 $\beta$ , iNOS, IL-6, TNF $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , NF $\kappa$ B, p-NF $\kappa$ B, p38, p-p38, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK and PARP

Lungs were quickly dissected and homogenized in a Wheaton Overhead Stirrer (no. 903475) using an extraction cocktail (10 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 100 mM sodium fluoride [NaF], 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate [NaVO<sub>4</sub>], 10 mg of aprotinin, and 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 3000g for 10 min. The supernatant was stored at -70 °C until it was used for immunoblotting. The protein levels were determined by the Bradford method using bovine serum albumin as the standard. The proteins (40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) were separated on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide by gel electrophoresis under reduced conditions and were then transferred electrophoretically onto the nitrocellulose membrane (Bio Rad, CA, USA, Ref. 162-0115). After blocking overnight at 4 °C with 5% non-fat milk in TBS-T (Tris-buffered saline 0.1% plus 0.05% Tween 20, pH 7.4), the membranes were incubated at room temperature for 3 h with primary antibodies against: anti-TNF $\alpha$  (1:1000); anti-IL6 (1:1000); IL-1 $\beta$  (1:2000); phospho-NF- $\kappa$ B (1:200); iNOS (1:1000); I $\kappa$ B $\alpha$  (1:1000); phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:1000); NF $\kappa$ B p65 (1:1000); phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S529, 1000); p38 (1:1000); phospho-p38 (1:1000); anti-JNK (1:1000); anti-phospho JNK (1:1000); ERK (1:1000); phospho-ERK 1/2 (1:200); and anti-PARP (1:1000) diluted in a buffer solution of TBS-T containing 3% non-fat milk. After washing six times (10 min each) in the TBS-T, the membranes were further reacted with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:80,000) [Ref. A6154] or anti-mouse secondary antibody (1:8000) [Ref. A5420], respectively (Sigma, USA) diluted in the TBS-T with 1% non-fat milk for 2 h at room temperature. An enhanced chemiluminescence reagent (Super Signal, Pierce, Ref. 34,080) was used to make the labeled protein bands visible in the C-DiGit<sup>®</sup> Blot Scanner (LI-COR, Nebraska, USA). For image quantification, the density of the pixels of each band was determined using the ImageJ 1.38 software. For each protein investigated, the results were confirmed in three sets of experiments. Immunoblotting for  $\beta$ -actin was performed as a control for the above protein blots. After the visualization of the protein blots with enhanced chemiluminescence, the protein antibodies were stripped from the membranes, which were reprobated with the monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (1: 2000 dilution, Sigma, USA). A protein densitometry was subsequently performed.

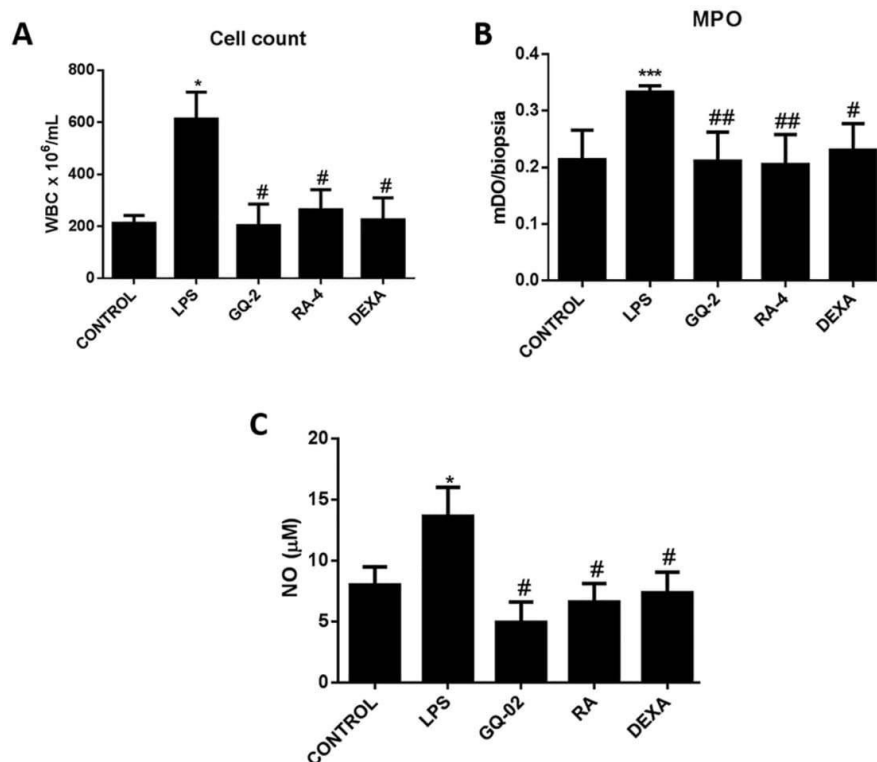
## 3. Statistical analysis

GraphPad Prism software (version 5) was used for the statistical analysis. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). Differences between the control and treated groups were analyzed using analysis of variance (ANOVA), prior to the performance Tukey's post hoc test or the Student's *t*-test. Probability values < 0.05 were considered significant.

## 4. Results

### 4.1. Effects of LPSF/RA-4 and LPSF/GQ-2 on LPS-induced histopathological changes in the ALI model

Samples of the lung tissues were collected 24 h after the LPS intranasal challenge and were processed for histology analysis. Lung tissue from the control group showed a normal alveolar structure, with no signs of cellular infiltration and thickening of the alveolar wall. However, the LPS group showed intense capillary congestion, cell



**Fig. 3.** A – BALF analysis shows intense cell migration in the LPS non-treated group, GQ-2, RA-4, and DEXA showed levels similar to the control group. Control versus LPS \* $P < 0.05$ , LPS versus groups # $P < 0.05$ . B – MPO assay on the lung tissue shows increased neutrophils in the LPS group and inhibition of cellular migration after pre-treatment with LPSF/RA-4, LPSF/GQ-2 and DEXA. Control versus LPS \*\*\* $P < 0.001$ ; LPS versus groups # $P < 0.01$  and ## $P < 0.001$ . C – LPS group showed significant elevated NO levels on BALF, in contrast, the other groups inhibited NO production ( $N = 10$ ). LPS versus the control group ( $N = 10$ ) \* $P < 0.05$ ; LPS versus groups # $P < 0.05$ .

inflammatory infiltration, hemorrhaging, and marked thickening of the alveolar wall. The new thiazolidinediones induced protection against the inflammatory changes, mainly the LPSF/GQ-2 group, which exhibited a similar morphology to the control group. Less expressively, dexamethasone reduced the LPS histopathology changes. The histopathological score confirmed the significant inhibition of the new TZDS derivatives on the structural changes induced by LPS (Fig. 2B).

#### 4.2. Inhibitory effects of the new thiazolidinediones on cell count, MPO and NO levels

The infiltration of the inflammatory cells in BALF was examined by cell count. As shown in Fig. 3A, the number of total cells was significantly increased after the LPS stimulation. By contrast, thiazolidinediones LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 reduced the infiltration of the inflammatory cells. Myeloperoxidase (MPO), an abundant hemoprotein of neutrophils was significantly increased in the LPS group but showed a similar reduction in the groups treated with the new thiazolidinediones—LPSF/GQ-2 and LPSF/GQ-4 and dexamethasone (Fig. 3B). The catabolism of Nitric oxide (NO) is considered an important indicator of the inflammatory process and oxidative stress. The analysis of its stable metabolites (nitrite/nitrate) was performed by the Griess reaction. The LPS group showed an intense NO production, which was significantly inhibited by in the LPSF/GQ-2, LPSF/RA-4 and DEXA pre-treated groups (Fig. 3C).

#### 4.3. Inhibitory effects of the new thiazolidinediones on the LPS-induced pro-inflammatory mediators — iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$

Immunohistochemistry assay for IL-1 $\beta$  and iNOS (Fig. 4A) revealed low staining in the control group. In contrast, the LPS group had a significant positive staining for IL-1 $\beta$  and iNOS in throughout the parenchyma (Fig. 4A). The groups subjected to the pre-treatment of LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 showed a reduction of IL-1 $\beta$  staining (Fig. 4A, C). The western blot analysis confirmed the significant reduction of IL-1 $\beta$  immunolabeling in LPSF/GQ-2 group (Fig. 5D). Only LPSF/GQ-2 and DEXA groups showed statistically significant inhibition of iNOS immunolabeling (Fig. 4A, B) confirmed by western blot analysis (Fig. 5A).

Other markers of inflammation such as the TNF $\alpha$  and IL-6 were analyzed by the western blot analysis. The result of the TNF $\alpha$  expression, an important acute inflammation mediator, showed high levels of expression in the LPS group (Fig. 5B). Interestingly, only the LPSF/GQ-2 and DEXA groups, reduced significantly the TNF $\alpha$  expression, exhibited levels similar to the control group (Fig. 5B). IL-6, an interleukin responsible for neutrophil recruitment, showed high expression in the LPS group, which correlates to the cell count (Fig. 3A). In contrast, all the pre-treated groups promoted a significant IL-6 reduction. However, among all treatments, the LPSF/GQ-2 group had the better anti-inflammatory performance.

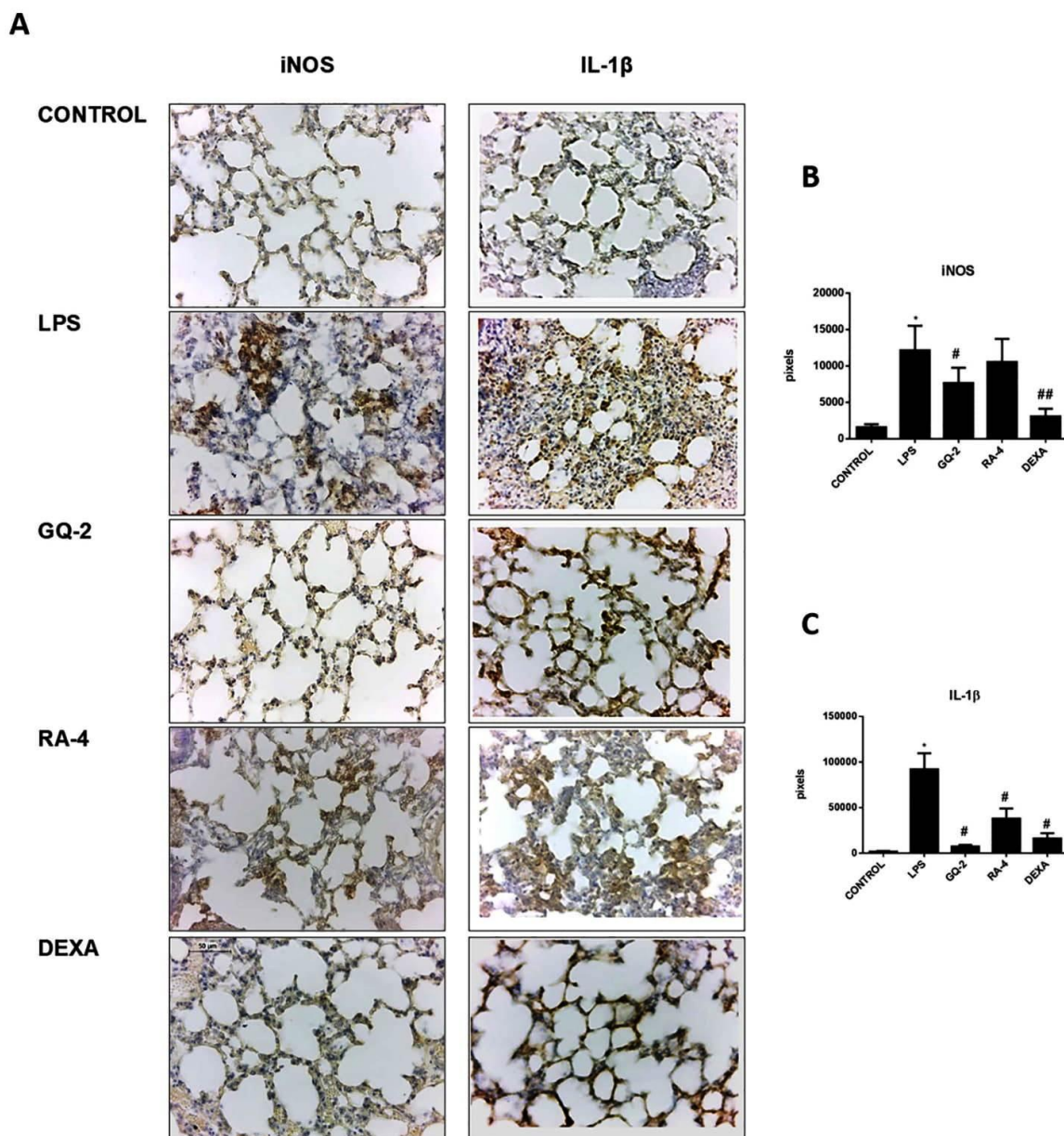


Fig. 4. A - Immunohistochemistry for iNOS and IL-1 $\beta$  in the lung. B - Densitometric analyses for iNOS. C - Densitometric analyses for IL-1 $\beta$ . The results are expressed as mean  $\pm$  SD of five different animals per group. Control versus LPS \* $p$  < 0.05; LPS versus groups # $p$  < 0.01; ## $p$  < 0.001. Bar = 50  $\mu$ m. Magnification: 400 $\times$ .

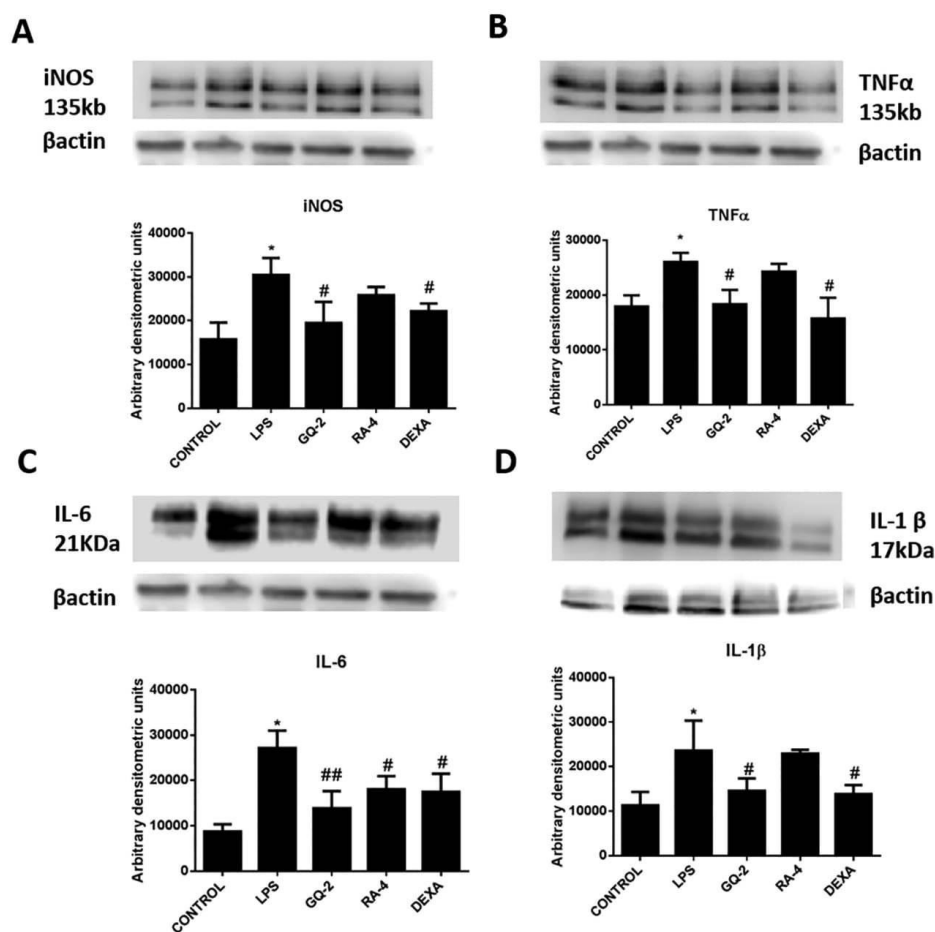
#### 4.4. LPSF/GQ-2 prevents I $\kappa$ B $\alpha$ phosphorylation and NF $\kappa$ B activation in acute lung injury

The nuclear factor Kappa B (NF $\kappa$ B) is involved in the induction of the expression of multiple pro-inflammatory factors [9]. The I $\kappa$ B proteins bind to the NF- $\kappa$ B via ankyrin repeats and blocks its nuclear import and thereby, its transcriptional activity. In contrast, the I $\kappa$ B phosphorylation results in the NF $\kappa$ B release and migration to the nucleus [11]. After 24 h, the LPS group showed intense levels of p-I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 6A and B) and p-NF $\kappa$ B (Fig. 6A and C). Conversely, the animals

subjected to the pre-treatment with LPSF/GQ-2 (30 mg/kg) and dexamethasone (1 mg/kg) showed low levels of NF $\kappa$ B and I $\kappa$ B phosphorylation (Fig. 6A, B, and C). In contrast, LPSF-RA4 showed no significant reduction for p-I $\kappa$ B $\alpha$  and p-NF $\kappa$ B expression (Fig. 6A, B and C).

#### 4.5. Inhibitory effects of LPSF/GQ-2 on MAPK pathways in LPS-induced acute lung injury

The MAPK signaling is also known to be important for the expression of pro-inflammatory factors and NF $\kappa$ B pathway activation [23]. As



**Fig. 5.** Effect of LPSF/RA-4 and LPSF/GQ-2 on cytokines and iNOS expression. The LPS group induced significant iNOS levels (A) as well as a significant expression of the pro-inflammatory cytokines TNFα (B), IL-6 (C) and IL-1β (D). LPSF/GQ-2 significantly reduced all inflammatory markers. Control versus LPS \* $P < 0.05$ . LPS versus treated groups # $P < 0.01$ ; ## $P < 0.001$ . The results represented at least three experiments.

shown in Fig. 7, the LPS stimulation increased the phosphorylation of ERK, JNK, and p38 protein expressions. In contrast, the LPSF/GQ-2 (30 mg/kg) and DEXA (1 mg/kg) pre-treatments inhibited the p-ERK and p-p38 expression (Fig. 7A, B and D). Only, LPSF/GQ-2 was able to reduce p-JNK levels (Fig. 7A and C). In contrast, LPSF/RA-4 showed no inhibitory effects on MAPK activation (Fig. 7).

#### 4.6. LPSF/GQ-2 prevents PARP expression in LPS-induced ALI

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) plays an important role in the regulation and maintenance of tissue inflammation [24]. After 24 h of LPS stimuli, the levels of the PARP were significantly augmented. Otherwise, the LPSF/GQ-2 pre-treatment was able to reduce the PARP expression in ALI induced by LPS (Fig. 8A, B). DEXA pre-treatment also protect against the PARP induction (Fig. 8A, B). However, LPSF/RA-4 showed no inhibitory effect against PARP induction.

## 5. Discussion

Acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) have a multi-factorial origin frequently seen in traumatically injured patients requiring intensive care [25]. There aren't effective pharmacological therapies available to treat ALI [26]. Corticosteroids are commonly employed in the management of ALI, however, clinical trials studies have not yet defined their efficacy [27]. The aim of the present study evaluated the effects of new TZDs derivatives, LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4 in LPS-induced ALI.

The activation of PPAR has an important anti-inflammatory effect, mainly inhibiting inflammatory signaling through NFκB [28]. PPAR agonists, chemically called thiazolidinediones (TZDs) represent a new opportunity for the management of inflammation. Some TZDs such as Pioglitazone and Rosiglitazone showed benefits effects in ALI models [29–31,28].

The analysis of pulmonary tissue and BALF revealed a beneficial effect of the new TZDs derivatives. MPO is released by activated

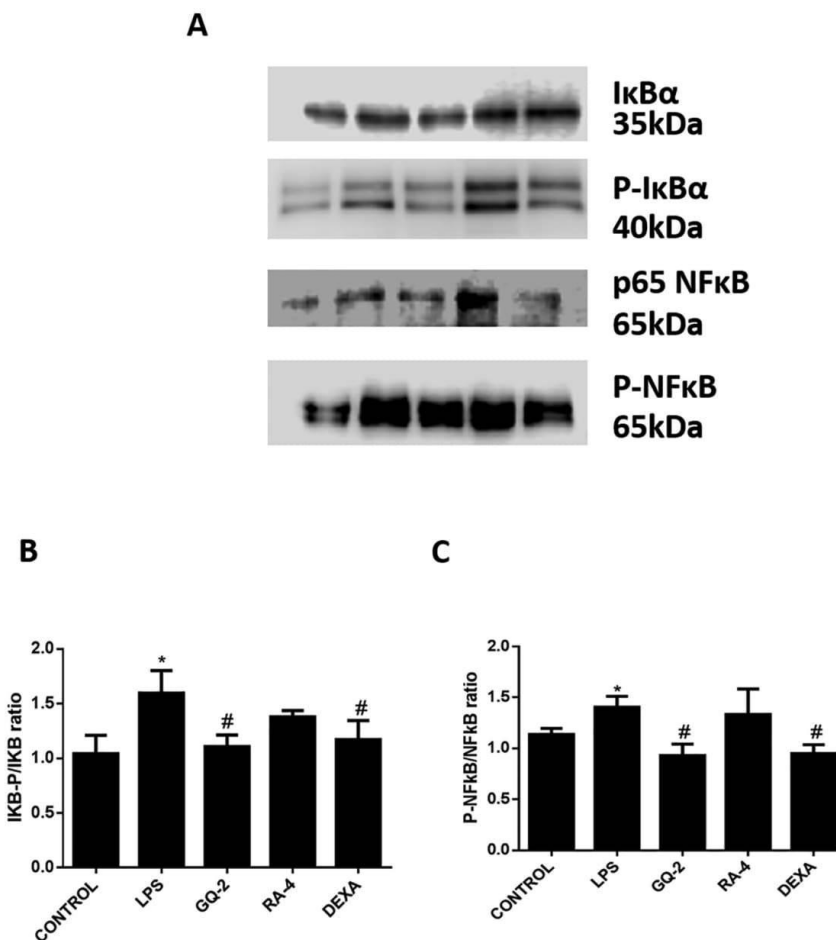


Fig. 6. A – Western blotting for IκB, p-IκB, NFκB and p-NFκB. The LPS group showed high levels of IκB (B) and NFκB phosphorylation (C). In contrast, the LPSF/GQ-2 group and the DEXA group prevented IκB (B) and NFκB phosphorylation (C). Control versus LPS group \* $P < 0.05$ ; LPSF/GQ2 versus LPS # $P < 0.05$ ; DEXA versus LPS # $P < 0.05$ . The results represented at least three experiments with three animals per pool group ( $N = 3$ ).

neutrophils, and as such, its measurement serves as an indicator for the activated neutrophils accumulation in the airspaces of the lungs [22]. On the other hand, during the inflammation process, Nitric Oxide (NO) is an important source of ROS generation, being produced by the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) [32]. The comparative effect of the new molecules on inflammatory cell infiltration, MPO, and NO production was similar to the dexamethasone (DEXA). However, LPSF/GQ-2 showed greater efficacy in preventing tissue alterations and NO production than DEXA and LPSF/RA-4.

In the lungs, the major cells expressing iNOS are alveolar macrophages, epithelial cells and inflammatory infiltrating cells (Allesio et al., 2017). The results of the present study demonstrated a significant inhibition of iNOS expression by LPSF/GQ-2 and DEXA.

ALI is almost invariably associated with elevations in pro-inflammatory mediators including TNF $\alpha$ , IL-1, and IL-6 [22]. Cytokine analysis was performed to evaluate the protection of the new molecules. There is evidence that bronchoconstriction is a dependent response to the TNF $\alpha$  stimulation in ALI [33]. Our analysis showed elevated levels of TNF $\alpha$  in mice that were LPS-induced. Only the LPSF/GQ-2 and DEXA

pre-treatments could prevent the TNF $\alpha$  production in LPS-induced ALI.

The function of the IL-1 is associated with the enhancing of neutrophil-dependent acute oxidative lung injury [34]. The data of the IL-1 $\beta$  expression levels between the groups were similar to the data obtained with the IL-6 expression, which is the major regulatory cytokine related with neutrophil migration [35]. Both TZDs (LPSF/GQ-2 and LPSF/RA-4) inhibited the IL-6 generation, but only LPSF/GQ-2 was able to prevent the IL-1 $\beta$  increased levels. Our results confirm other analyses that were performed in experimental models of atherosclerosis and hepatic steatosis, in which LPSF/GQ-2 was considered efficient in reducing the parameters of inflammation progression [19,36].

The NFκB activation develops an important role in ALI/ARDS (Moine et al., 2000). An excessive activation of the NFκB results in an acute inflammatory injury to the lungs in critically ill patients [10]. In general, the classical pathway of the NFκB activation involves the phosphorylation of its inhibitory protein IκB $\alpha$  by a kinase complex (IKKs) [37]. LPS induces the NFκB activation by TLRs, mainly TLR4, which stimulates two responses called the MYD88 dependent pathway and the MYD88 independent pathway; both resulting in IKK



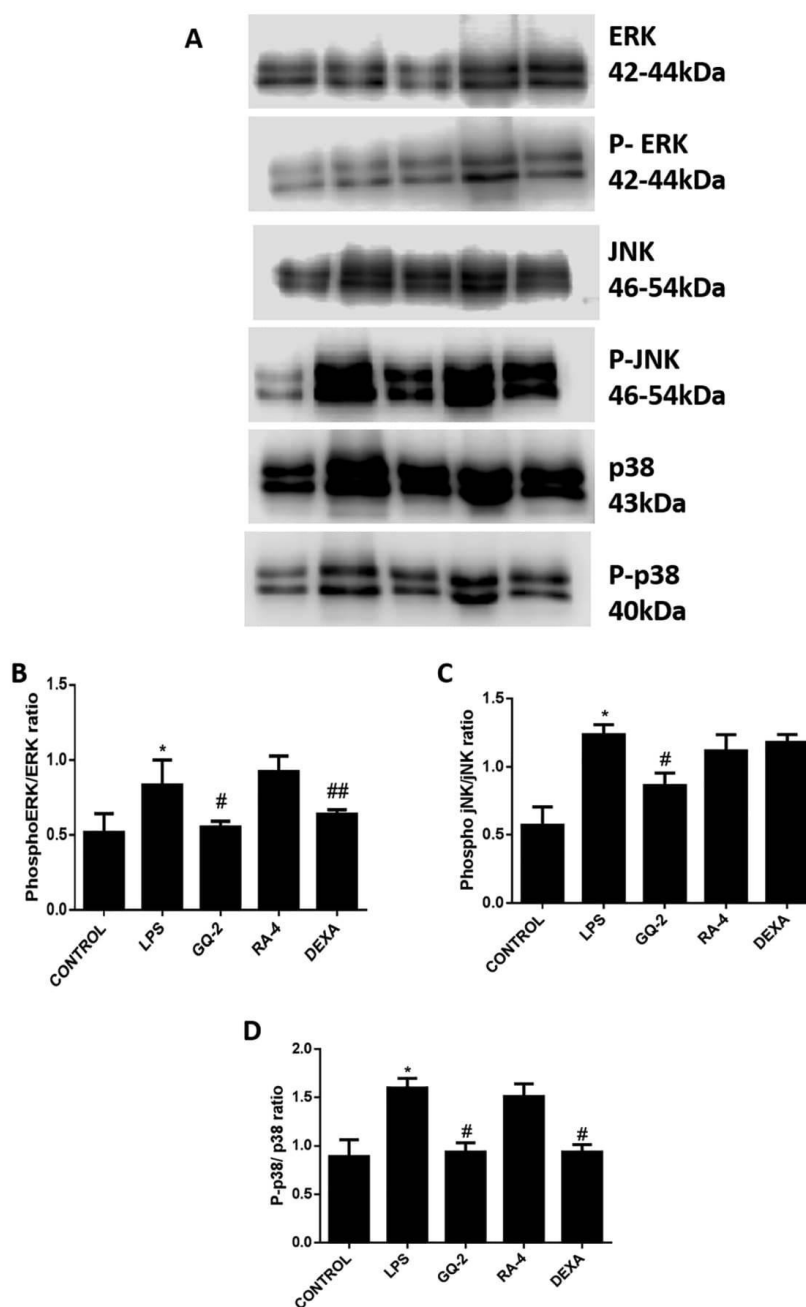


Fig. 7. Western blotting for MAPKs (ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38). Control versus LPS  $\cdot P < 0.05$ ; LPS versus GQ-2 or DEXA  $\cdot P < 0.05$ . The results represented at least three experiments with three animals per pool group (N = 3).

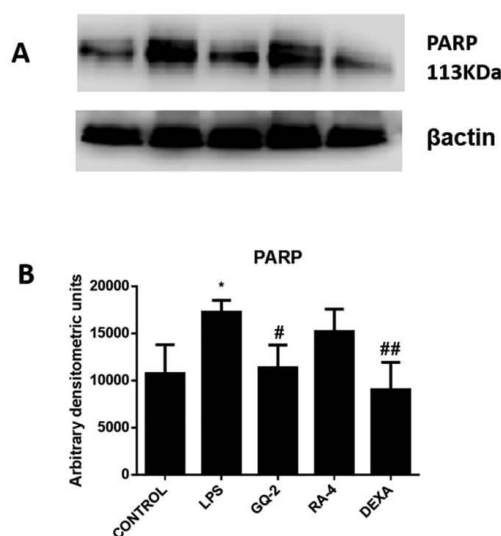


Fig. 8. A – Western Blot for PARP protein expression. LPSF/GQ-2 prevents PARP expression in LPS-induced ALL. B – Densitometric analyses. Control versus LPS \* $P < 0.05$ . LPS versus LPSF/GQ-2 or DEXA # $P < 0.05$ . The results represented at least three experiments with three animals per pool group (N = 3).

phosphorylation [38]. Our results showed high phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  levels 24 h after the LPS stimuli. In contrast, the pre-treatment with LPSF/GQ-2 offered protection against the I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and the subsequent NF $\kappa$ B pro-inflammatory response. The activators of the IKK complex include mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and represent a convergence point for numerous stimuli, including ligands for Toll-like receptors (TLRs) [39].

The mammalian family of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) includes extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK). All MAPKs are activated by diverse extracellular and intracellular stimuli [40]. The JNK and p38 signaling pathways are activated by pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , or in response to cellular stresses such as genotoxic, osmotic, hypoxic, or oxidative stress [40]. The ERK is considered a vital mediator of a number of cellular processes including growth, proliferation, and survival [23]. Some studies also attributed the ERK activation to TNF $\alpha$  production [41]. Our study showed significant enhanced levels of p-ERK, p38 MAPK and p-JNK in the LPS group, whereas the LPSF/GQ-2 significantly reduced significantly all phosphorylated forms of MAPKs.

p38 MAPK is a critical enzyme for cytokine TNF production, bronchoconstriction, and LPS-induced pulmonary inflammation [42]. Due to its crucial role, the p38 MAPK represents an important target of intervention in ARDS. Our results demonstrated that the LPSF/GQ-2 could protect against the p38 activation and the subsequent TNF $\alpha$  expression. Therefore, the anti-inflammatory effect of GQ-2 is due in part to the inhibition of p38 and JNK pathway, which involves the TNF $\alpha$  and ROS production, respectively.

Some TZDs presents some adverse effects of include weight gain, fluid retention, myocardial infarction and bladder cancer. These side effects limited the usage of these drugs and many efforts have been made to develop more safer and effective TZDs to treat inflammation [43]. These undesirable side effects could be explain by activation of some “off targets” (GPR40) or/and stress kinase pathways (ERK), which impairs the PPAR $\gamma$  activation, and induces an inflammatory profile [44]. The GPR40, also called free acid receptor (FFAR1), is expressed in

lung epithelial cells and other tissues [45,46] and could be activate by some TZDs [47]. On the other hand, the stress kinase ERK is often linked to inflammation through phosphorylation and subsequent inactivation of PPAR $\gamma$  [48]. Recently, a study provided new structural insights for new TZDs development to reduce PPAR $\gamma$  adverse side effects [49].

According to our results, the LPSF/GQ-2 reduced the levels of p-ERK, p-p38 and p-JNK, and in contrast, LPSF/RA-4 exhibited MAPKs levels similar to the LPS group. These results indicate the anti-inflammatory role of LPSF/GQ-2, and a potential to minimize adverse side effects, since it reduced significantly p-ERK. Besides, the absence of ERK inhibition by LPSF/RA-4 could explain its low anti-inflammatory activity expressed by several inflammatory markers (NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , iNOS).

Excessive activation of the PARP-1 induces mitochondria-associated cell death in the injured tissues and constitutes another mechanism for exacerbating inflammation [50]. In this study, LPSF/GQ-2 reduced PARP and p-p38 expression, indicating that the modulation of the PARP expression could be related to inhibition of the p38 signaling. However, other analyses using specific inhibitors for MAPKs and knockout animals may be useful to confirm the LPSF/ GQ-2 anti-inflammatory actions in ALL.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) (CNPq; #301777/2012-8).

#### References

- [1] G.D. Rubenfeld, et al., Incidence and outcomes of acute lung injury, *N.Engl.J Med* 353 (1533–4406) (2005) 1685–1693 (Electronic).
- [2] J. Villar, et al., The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation, *Intensive Care Med.* 37 (12) (2011) 1932–1941.
- [3] A.J. Walkey, et al., Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches, *Clinical Epidemiology* 4 (2012) 159–169.
- [4] D. Ashbaugh, et al., Acute respiratory distress in adults, *Lancet* 290 (7511) (1967) 319–323.
- [5] H. Laycock, A. Rajah, Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a review article, *British Journal of Medical Practitioners* 3 (2) (2010) 33–39.
- [6] Z. Ma, et al., Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression, *Inflammation* 36 (6) (2013) 1560–1566.
- [7] G.S. Worthen, et al., Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury: synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung, *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1) (1987) 19–28.
- [8] M. Guha, N. Mackman, LPS induction of gene expression in human monocytes, *Cell. Signal.* 13 (2) (2001) 85–94.
- [9] Q. Li, I.M. Verma, NF-kappaB regulation in the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (10) (2002) 725–734.
- [10] M. NYS, et al., Bronchoalveolar lavage fluids of ventilated patients with acute lung injury activate NF- $\kappa$ B in alveolar epithelial cell line: role of reactive oxygen/nitrogen species and cytokines, *Nitric Oxide Biol. Chem.* 9 (1) (2003) 33–43.
- [11] Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway, *Trends Biochem. Sci.* 29 (2) (2004) 72–79.
- [12] J. Becker, et al., Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20 (5) (2006) 429–447.
- [13] H.J. Patel, et al., Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy, *J. Immunol.* 170 (5) (2003) 2663–2669.
- [14] X. Zhang, H.A. Young, PPAR and immune system—what do we know? *Int. Immunopharmacol.* 2 (8) (2002) 1029–1044.
- [15] K.A. Burns, Heuvel J.P. Vanden, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1771 (8) (2007) 952–960.
- [16] S. Azhar, NIH public access, *Futur. Cardiol.* 6 (5) (2011) 657–691.
- [17] D. Usuda, T. Kanda, Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension, *World J. Cardiol.* 6 (8) (2014) 744–754.
- [18] K.P.S. Barbosa, et al., Reduction of Carrageenan-induced Acute Pulmonary Inflammation in Mice by Novel Thiiazolidinedione Derivative LPSF/RA-4, *European Journal of Pharmacology*, 2013.
- [19] A.K.S.E. Silva, et al., Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and

- atherosclerosis development in LDLr<sup>-/-</sup> mice, *Eur. J. Pharmacol.* 791 (2016) 622–631 (n. September).
- [20] R.H. Mouro, et al., Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (11) (2005) 1129–1133.
- [21] L.A.M. Santos, et al., Diethylcarbamazine inhibits NF- $\kappa$ B activation in acute lung injury induced by carrageenan in mice, *Int. Immunopharmacol.* 23 (1) (2014).
- [22] G. Matute-Bello, et al., An official American thoracic society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (5) (2011) 725–738.
- [23] D.W. Hommes, M.P. Peppelenbosch, S.J.H. Van Deventer, Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets, *Gut* 52 (1) (2003) 144–151.
- [24] X. Luo, W.L. Kraus, On PAR With PARP: Cellular Stress Signaling Through Poly (ADP-ribose) and PARP-1. v. 1, (2012), pp. 417–432.
- [25] M. Bakowitz, B. Bruns, M. McCunn, Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in the injured patient, *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 20 (1) (2012) 54.
- [26] A.J. Boyle, R.M.A.C. Sweeney, D.F. McAuley, Pharmacological treatments in ARDS: a state-of-the-art update, *BMC Med.* 11 (1) (2013) 166.
- [27] M.A. Matthay, D.F. McAuley, L.B. Ware, Clinical trials in acute respiratory distress syndrome: challenges and opportunities, *Lancet Respir. Med.* 5 (6) (2017) 524–534.
- [28] A. Croasdell, et al., PPAR  $\gamma$  and the innate immune system mediate the resolution of inflammation, *PPAR Res.* 2015 (Figure 1) (2015).
- [29] O. Soehnlein, Pioglitazone Attenuates Endotoxin-induced Acute Lung Injury by Reducing Neutrophil Recruitment. v. 40, n. 2, (2012), pp. 416–423.
- [30] Y. Aoki, et al., Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand, suppresses bleomycin-induced acute lung injury and fibrosis, *Respiration* 77 (2009) 311–319.
- [31] G. Wang, et al., Activation of PPAR $\gamma$  attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibition of HMGB1-RAGE levels, *Eur. J. Pharmacol.* 726 (1) (2014) 27–32.
- [32] A. Van Der Vliet, C.E. Cross, Oxidants, nitrosants, and the lung, *Am. J. Med.* 109 (5) (2000) 398–421.
- [33] D. Togbe, et al., Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury, *Int. J. Exp. Pathol.* 88 (6) (2007) 387–391.
- [34] J.E. Repine, Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury, *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 10) (1994) 75–78.
- [35] P. Müller, et al., Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) potentiates autoimmune hepatitis in the CYP2D6 mouse model, *J. Autoimmun.* 69 (2016 May) 51–58.
- [36] E. Soares, A.K. Silva, et al., LPSF/GQ-02 inhibits the development of hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *PLoS One* 10 (4) (2015) e0123787.
- [37] B. Hoesel, J.A. Schmid, The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer, *Mol. Cancer* 12 (1) (2013) 86.
- [38] T. Kawai, S. Akira, Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like Receptors. v. 13, n. 11, (2007).
- [39] P.N. Moynagh, The NF- $\kappa$ B pathway, *J. Cell Sci.* 118 (20) (2005) 4589–4592.
- [40] E.K. Kim, E.-J. Choi, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases, *Biochim. Biophys. Acta* 1802 (4) (2010) 396–405.
- [41] K. Schuh, A. Pahl, Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury, *Biochem. Pharmacol.* 77 (12) (2009) 1827–1834.
- [42] Schnyder-Candrian, et al., Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome, *J. Immunol.* 175 (1) (2005) 262–269 Jul 1.
- [43] S. Wang, E.J. Dougherty, R.L. Danner, PPAR $\gamma$  signaling and emerging opportunities for improved therapeutics, *Pharmacol. Res.* 111 (2016) 76–85.
- [44] N.J. Smith, et al., The action and mode of binding of thiazolidinedione ligands at free fatty acid receptor 1, *J. Biol. Chem.* 284 (26) (2009) 17527–17539.
- [45] D. Gras, et al., Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296 (6) (2009) (p. L970–L978).
- [46] A.D. Mancini, V. Poitout, The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol. Metab.* 24 (8) (2013) 398–407.
- [47] K. Kotarsky, et al., A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2) (2003 Feb 7) 406–410.
- [48] M. Adams, et al., Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site, *J. Biol. Chem.* 272 (8) (1997) 5128–5132.
- [49] J.Y. Jang, et al., Structural basis for the enhanced anti-diabetic efficacy of Lobeglitazone on PPAR $\gamma$ , *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 31.
- [50] X. Ba, N.J. Garg, Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases, *Am. J. Pathol.* 178 (3) (2011) 946–955.

### APÊNDICE C – Participação em trabalhos publicados (Co-autoria)

FRAGOSO, I. T. et al. Diethylcarbamazine attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by apoptosis of inflammatory cells. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 69, n. 1, p. 81 - 89, 2017;


SOARES E SILVA, A. K. et al. LPSF/GQ-02 Inhibits the Development of Hepatic Steatosis and Inflammation in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Plos One**, San Francisco, v.10, n. 4, p.e0123787, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397012/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

RODRIGUES, G. B. et al. Diethylcarbamazine: Possible therapeutic alternative in the treatment of alcoholic liver disease in C57BL/6 mice. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v.42, p.369 - 379, 2015;

RODRIGUES, G. B. et al. Characterization and evaluation of nanoencapsulated diethylcarbamazine in model of acute hepatic inflammation. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v. 50, p.330 - 337, 2017;

FRANÇA, M. E. R. et al. Diethylcarbamazine attenuates the expression of pro-fibrogenic markers and hepatic stellate cells activation in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, v. 26, n. 2, p. 599 - 609, 2018;

## APÊNDICE D - Aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEUA)

 **Fiocruz**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

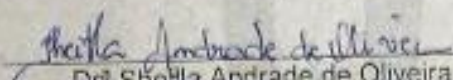
**Certificado de Aprovação**

Certificamos que o projeto intitulado: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA SÉRIE DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS LPSE/RA-4 E LPSE/GQ-2 EM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR" protocolado sob nº 101/2016 pelo (a) pesquisador (a) Dra Christina Alves Peixoto está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 15/12/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 15 de dezembro de 2018 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (BALB/ c)	140 (20-25 gr/ 06 semanas/ machos)
<b>TOTAL</b>	<b>140</b>

We certify that project "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA SÉRIE DE NOVOS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS LPSE/RA-4 E LPSE/GQ-2 EM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR" (CEUA Protocol nº 101/2016) coordinated by CHRISTINA ALVES PEIXOTO is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on december, 15, 2016. In present version this project is licensed and valid until december 2018 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) December, 15, 2016

  
Dr<sup>a</sup> Sheila Andrade de Oliveira  
Coordenadora CEUA/CPqAM

**Dr<sup>a</sup> Sheila Andrade de Oliveira**  
Coordenadora da Comissão de Ética  
no Uso de Animais - CEUA  
Mat. SIAPE 1554975  
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br  
CPqAM/Fiocruz