



## EFEITOS DO AGONISTA PARCIAL PPAR $\gamma$ A1 NA INFLAMAÇÃO PULMONAR

*Roberta Nunes, Larissa Benvenuti, Carlos Rafael Vaz, José Roberto Santin, Nara Lins Meira Quintao, Fátima de Campos Buzzi, Maria Eduarda Signorini Pereira*

Farmacologia - Farmacologia Geral

### Resumo

As infecções respiratórias têm ganhado repercussão após a pandemia da COVID-19. Esse processo tem papel importante na proteção do trato respiratório contra microrganismos infecciosos e alérgenos. No entanto, ao mesmo tempo que os componentes da imunidade inata atuam protegendo o aparelho respiratório contra possíveis imunógenos, um aumento exacerbado de neutrófilos e macrófagos alveolares podem provocar lesão pulmonar aguda e crônica. Os agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR) tem grande importância na atuação anti-inflamatória, por inibirem inúmeros componentes da cascata inflamatória, desde o nível celular ao vascular. O presente trabalho investiga a atividade do agonista parcial PPAR $\gamma$  A1 na inflamação do trato respiratório utilizando o modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) induzido por LPS, bem como modelo de inflamação pulmonar in vitro utilizando células pulmonares humanas (A549). Os resultados obtidos, mostram que este composto é capaz de diminuir a migração de leucócitos para o sítio de inflamação, diminuir a secreção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e CXCL1) no lavado broncoalveolar (LBA) e tecido pulmonar, diminuir a produção de mieloperoxidase (MPO) e diminuir de forma significativa os mediadores inflamatórios produzidos pelas células A549. Além disso, o composto não apresenta citotoxicidade sobre essas células. Os resultados anti-inflamatórios obtidos no modelo de SDRA parecem depender da ação do A1 no receptor PPAR $\gamma$ , uma vez que o seu antagonista reverteu alguns dos seus efeitos. Em conjunto, os dados mostram o composto A1 como uma importante ferramenta terapêutica para tratamento inflamações pulmonares. Até então, existe um grande desafio para tratamento de doenças pulmonares, sendo assim, evidencia-se a necessidade de investimento em pesquisas e estudos sobre agentes anti-inflamatórios alternativos para tratamento dessa patologia.

### Introdução

As infecções respiratórias têm ganhado repercussão após a pandemia da COVID-19. Esse processo tem papel importante na proteção do trato respiratório contra microrganismos infecciosos e alérgenos. No entanto, ao mesmo tempo que os componentes da imunidade inata atuam protegendo o aparelho respiratório contra possíveis imunógenos, um aumento exacerbado de neutrófilos e macrófagos alveolares podem provocar lesão pulmonar aguda e crônica (BOUSQUET et al. 2006), levando a incompetência pulmonar parenquimatosa e chegando a acarretar falência de órgãos (ASTI et al. 2000).

Neste contexto, dentre as principais preocupações, está a falta de tratamentos comprovados cientificamente, eficazes e seguros. Até o momento, o principal



tratamento para essas condições clínicas são o uso de anti-inflamatórios. No entanto, esses fármacos apresentam efeitos adversos e visam apenas inibir vias inflamatórias. Atualmente, o desenvolvimento de novas moléculas com potencial anti-inflamatório está voltada para a estimulação de vias de resolução do processo inflamatório, levando a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), modificando o fenótipo de macrófagos M1 para M2, estimulando a eferocitose e a reparação tecidual (PERETTI et al. 2015).

Os agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR) tem grande importância na atuação anti-inflamatória, por inibirem inúmeros componentes da cascata inflamatória, desde o nível celular ao vascular. Nesse sentido, existe um interesse significativo no desenvolvimento de novos fármacos moduladores de PPAR $\gamma$  com baixo potencial de efeitos adversos indesejáveis, uma vez que esses compostos demonstraram grande potencial como fármacos anti-inflamatórios em vários estudos, principalmente em inflamação das vias aéreas.

O presente trabalho investigou a atividade do agonista parcial PPAR $\gamma$  A1 na inflamação do trato respiratório utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

#### Método

Para avaliação do composto A1 em modelos animais, foi desenvolvido o modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) em camundongos *Swiss* (CEUA: 015/22). Os animais receberam o tratamento 3 horas antes da indução de dano pulmonar. Após 3 horas os animais foram anestesiados e receberam uma dose intranasal de LPS diluído em salina estéril (4 mg/kg). Após 12 horas da instilação de LPS os animais receberam novamente o tratamento correspondente por via oral. Após 24 horas da instilação do LPS, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica e o lavado broncoalveolar (LBA) e os pulmões foram coletados para contagem de células inflamatórias e determinação de citocinas inflamatórias (ELISA) e MPO.

Para avaliar o efeito do composto A1 *in vitro*, foram utilizadas células A549 (células de pulmão de linhagem humana) provenientes do Banco de Células do RJ. Inicialmente, para excluir possíveis efeitos citotóxicos do composto A1 sobre células A549 foi realizado o teste de viabilidade celular pela técnica de redução do Sal de Tetrazolium (MTT). As culturas celulares de A549 foram plaqueadas e mantidas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas, 10  $\mu$ L de A1 foi adicionado. Como controle positivo e negativo de citotoxicidade foram empregados DMSO a 10% e meio DMEM, respectivamente. Após 21 horas de incubação, foi adicionado 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) e a placa mantida mais 3 horas em estufa. Ao término desse período, o sobrenadante foi retirado, e para a dissolução dos cristais formados pela redução do MTT foi adicionado 100  $\mu$ L de DMSO. A densidade óptica de cada poço foi determinada em espectrofotômetro de microplacas em 570 nm. Após avaliação da citotoxicidade, as células A549 foram estimuladas com LPS (10  $\mu$ g/mL) e no sobrenadante das células foram avaliados mediadores inflamatórios como citocinas (ELISA) e óxido nítrico (NO) (Griess).



## Resultados e discussões

A pandemia da COVID-19 trouxe à tona os efeitos e as complicações que um processo inflamatório pulmonar exacerbado pode provocar. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou os efeitos do composto A1 utilizando um modelo de SDRA induzido por LPS. Os resultados obtidos mostram diminuição de leucócitos no LBA, especialmente nas doses de 10 e 30 mg/kg do composto A1, bem como na dose de 0,5 mg/kg do grupo dexametasona. Houve também uma diminuição dos leucócitos polimorfonucleares e mononucleares.

A fim de avaliar microscopicamente a redução de células inflamatórias, os tecidos pulmonares foram submetidos a análises histológicas. Os resultados mostraram estruturas intactas da parede alveolar dos tecidos pulmonares dos camundongos do grupo *naive* e dexametasona 0,5 mg/kg. Em contraste, uma grande quantidade de células inflamatórias e espessamento da parede alveolar foram observados em tecidos pulmonares do grupo LPS. No entanto, o tratamento com o composto A1 nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg reverteu significadamente essas mudanças induzidas pelo LPS.

A escolha pela utilização do composto A1 baseou-se na informação de que agonistas PPAR possuem papel modulatório em respostas imunes e inflamatórias, especialmente em lesões pulmonares agudas induzidas por LPS (HU et al. 2020) além do mais, estudos prévios realizados em nosso laboratório, demonstraram que o composto A1 possui atividade anti-inflamatória *in vitro*, regulando a migração de células, secreção de citocinas, quimiotaxia e eferocitose de neutrófilos, além de não possuir efeitos toxicológicos agudos e crônicos (dados não publicados).

Um dos grandes desafios nas doenças respiratórias, especialmente na COVID-19, é controlar a cascata de citocinas inflamatórias, que na maioria dos casos, acaba complicando o prognóstico dos pacientes. O composto A1 foi capaz de diminuir a secreção das principais citocinas inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-5 e CXCL1) no LBA e tecido pulmonar, além de diminuir a produção de MPO nesses mesmos tecidos.

Na inflamação pulmonar, as citocinas desempenham um papel vital contra microorganismos, mas respostas imunes excessivas e desreguladas causam danos ao sistema imunológico. No contexto da SDRA/COVID-19, pacientes com doença grave apresentam linfopenia, neutrofilia, níveis mais baixos de fatores antivirais e IFNs e concentrações séricas mais altas de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF, conhecida como “tempestade de citocinas” (YANG et al. 2021). A diminuição conjunta de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL1 implica diretamente na regressão do processo inflamatório, resultando na diminuição da migração de células e produção/secreção de citocinas inflamatórias, colaborando para a recuperação da homeostasia.

Com o objetivo de verificar a participação da via PPAR $\gamma$  no mecanismo de ação do composto A1 na inflamação induzida por LPS, foi avaliado o efeito do antagonista PPAR $\gamma$



GW9662 administrado concomitantemente ao agonista PPAR $\gamma$  A1. O composto GW9662 reverteu de maneira significativa o efeito anti-inflamatório do composto A1, evidenciando o envolvimento da via PPAR $\gamma$  no efeito anti-inflamatório do presente composto.

Os resultados *in vitro*, mostram que o composto é capaz de diminuir a produção de NO e IL-6 pelas células pulmonares, sendo desprovido de efeitos citotóxicos sobre as células.

### Considerações finais

Em conjunto, os dados mostram o composto A1 como uma importante ferramenta terapêutica para tratamento de SDRA. Até então, existe um grande desafio para tratamento de doenças pulmonares, sendo assim, evidencia-se a necessidade de investimento em pesquisas e estudos sobre agentes anti-inflamatórios alternativos para tratamento dessa patologia.

Palavras-chave: Inflamação pulmonar; COVID-19; Citocinas

ASTI, C. et al. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and hemorrhagic lung damage. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 13, n. 2, p. 61-69, 2000.

GOPALAKRISHANAN, A.; JOSEPH, J.; SHIRLEY, K. A.; KEEGAN, A. D.; BOUKHVALOVA, M. S.; VOGEL, S. S.; BLANCO, J. C. G. Protection against influenza-induced Acute Lung (ALI) by enhanced induction of M2a macrophages: possible role of PPAR $\gamma$ /RXR ligands in IL-4-induced M2a macrophage differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022.

PERRETTI, M.; LEROY, X.; BLAND, E. J.; MONTERO-MELENDZ, T. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 36, n. 11, p. 737-755, 2015.

RAMIREZ-MORAL, I.; FERREIRA, B. L.; VOS, A. F.; POLI, T. V.; Post-treatment with the PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone inhibits inflammation and bacterial growth during Klebsiella pneumonia. *Respiratory Research*, v. 22, 2021.

TOMBOLATO, M. M.; DE OLIVEIRA, J. B.; CARDOSO, C. A. L. Análise epidemiológica de doenças respiratórias entre 2015 e 2020 no território brasileiro. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, 2021.

VAN HOECKE, L. et al. Bronchoalveolar lavage of murine lungs to analyze inflammatory cell infiltration. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2017, n. 123, p. 55398, 2017.

YANG, S. C.; YUNG, F. T.; YEN-LIN, P.; TSONG-LONG, H. Understanding the of neutrophil in acute respiratory distress syndrome, *Biomedical Journal*, v. 44, p. 439-446, 2021.