UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeito do agonista PPAR LYSO-7 sobre a instalação e cicatrização de úlceras gástricas induzidas em camundongos

José Roberto Santin

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR
Orientador:
Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santin, José Roberto
S335e Efeito do agonista PPAR LYSO-7 sobre a instalação e cicatrização de úlceras gástricas induzidas em camundongos / José Roberto Santin. -- São Paulo, 2013.
104p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Análise toxicológica 2. Farmacologia I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.907 CDD

Nome: SANTIN, José Roberto

Título: Efeito do agonista PPAR LYSO-7 sobre a instalação e cicatrização de úlceras gástricas induzidas em camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese a minha amada esposa
Isabel Daufenback Machado

“De tudo, ao meu amor serei atento antes,
e com tal zelo, e sempre, e tanto que mesmo
em face do maior encanto dele se
encante mais meu pensamento”

Vinicius de Moraes

A minha orientadora Sandra Farsky, pessoa que admiro pela competência e dedicação à pesquisa e ao ensino. E que no meio de tantos projetos, artigos e experimentos, se transformou em mais que uma professora, uma grande amiga.

A profa. Suely Lins Galdino (in memoriam), colaboradora deste trabalho e mais que isto, uma pessoa que lutava pelo crescimento e fortalecimento da ciência farmacêutica no Brasil. Muito obrigado por tudo.

"Um galo sozinho não tece uma manhã: ele precisará sempre de outros galos. De um que apanhe esse grito que ele e o lance a outro; de um outro galo que apanhe o rito de um galo antes e o lance a outro; e de outros galos que com muitos outros galos se cruzem os fios de sol de seus gritos de galo, para que a manhã, desde uma teia tênue, se vá tecendo, entre todos os galos. E se encorpando em tela, entre todos, se erguendo tenda, onde entrem todos, se entretendendo para todos, no toldo (a manhã) que plana livre de armação. A manhã, toldo de um tecido tão aéreo que, tecido, se eleva por si: luz balão. Somos vossos frutos..."

Poema citado pela profa. Suely Galdino no encerramento do primeiro congresso brasileiro da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas (ABCF), realizado em Ipójuca, Porto de Galinhas, Pernambuco em 2012.

AGRADECIMENTOS

Embora uma tese de doutorado seja pela sua finalidade acadêmica um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, pela força e fé.

A minha namorada, noiva é agora esposa Isabel Daufenback Machado, por sempre estar ao meu lado me apoiando e ajudando! Amo você!

Aos meus pais e irmãs pela minha formação pessoal e principalmente por respeitarem e acreditarem nas minhas decisões.

Ao meu sogro e à minha sogra pelo sincero apoio durante o doutorado.

A todos meus amigos, pois como diria Vinicius de Moraes, mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações. Pois boas lembranças são marcantes, e o que é marcante nunca se esquece! Uma grande amizade mesmo com o passar do tempo é cultivada assim!

A orientadora deste trabalho, professora Sandra Farsky, que mais que orientadora foi amiga, muito obrigado por tudo.

Aos professores Ivan da Rocha Pitta e Suely Lins Galdino, professores e alunos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por cederem o composto LYSO-7 para execução deste trabalho.

Aos docentes do departamento de Análises Clinicas e Toxicológicas que, em maior ou menor grau, contribuíram para minha formação e que sempre estiveram abertos às minhas indagações.

Aos funcionários do departamento de Análises Clinicas e Toxicológicas, em especial a Dona Luzia, Ângelo e Samantha.

À banca de defesa pela disponibilidade em participar e compartilhar com deste momento tão importante.

A FAPESP pela bolsa de doutorado (2010/17175-0) e pelo projeto de auxílio à pesquisa (2011/01848-8).

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes."

Marthin Luther King

RESUMO

SANTIN, J. R. **Efeito do agonista PPAR LYSO-7 sobre a instalação e cicatrização de úlceras gástricas induzidas em camundongos.** 2013. 104f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A úlcera gástrica é uma doença crônica, de alta prevalência, e a eficácia dos tratamentos farmacológicos disponíveis é limitada pela alta incidência de efeitos adversos. Neste trabalho é mostrado o mecanismo de ação terapêutica e os efeitos toxicológicos da molécula indol-tiazolidínica LYSO-7 em diferentes modelos experimentais de úlcera gástrica. Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo, LYSO-7 (5, 25 ou 50 mg/kg, v.o.) ou bezafibrato (25 ou 50 mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração oral de Et/HCl (60%/0,03 M) ou indometacina (100 mg/kg). Em outro conjunto de ensaios, animais foram pré-tratados com GW9962, um antagonista PPARγ (2 mg/kg, i.p.); anticorpo anti-granulócito (50 µL, i.p.), ou L-NAME (70 mg/kg, i.p) 1 hora antes dos tratamentos com veículo ou LYSO-7. Uma hora após administração da solução de Et/HCl, os neutrófilos foram quantificados no sangue e medula óssea, a rede microcirculatória gástrica foi estudada em *in situ,* utilizando a técnica de microscopia intravital; o tecido gástrico foi utilizado para quantificar a percentagem de área lesada, atividade da MPO, a expressão gênica e proteica de PPARγ, expressão proteica de iNOS e eNOS, e a atividade das enzimas catalase, SOD, GPx, GR e GST. Uma hora após a administração de indometacina, o tecido gástrico foi removido para avaliar a eficácia do tratamento e a secreção de mediadores inflamatórios. Ensaio de úlcera crônica, induzida por ácido acético, foi realizado em camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$, aplicando-se 20µL de ácido acético na camada subserosa do estômago e 24 horas após a indução, os animais foram tratados, uma vez ao dia, durante sete dias com LYSO-7 (50 mg/kg), bezafibrato (50 mg/kg) ou veículo. Foram realizados ensaios com macrófagos recrutados para o peritônio pela ação do tioglicolato de sódio (3%, i.p.) e com neutrófilos recrutados pela ação do glicogênio de ostra (1%, i.p.). Ensaios de toxicologia aguda, crônica e mutagenicidade também foram realizados. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com LYSO-7 reduz a área lesada, o influxo de neutrófilos e a estase da rede microcirculatória provocada pela administração de Et/HCl. Os efeitos protetores foram revertidos em animais pré-tratados com GW9962, indicando a participação do PPARγ no efeito. O influxo de neutrófilos é determinante para a lesão, uma vez que a depleção destas células reduziu a ulceração gástrica, e indica que o bloqueio da mobilização de neutrófilos da medula óssea para o sangue e destes para o tecido lesado pela LYSO-7 pode ser um mecanismo de ação gastroprotetora desta molécula. A reversão da estase vascular na microcirculação, mas não o influxo de neutrófilos, é mediado pelo NO, pois o pré-tratamento com L-NAME aboliu os efeitos da LYSO-7 no restabelecimento do fluxo sanguíneo da microcirculação. Este efeito pode ser dependente da maior e menor expressão proteica de eNOS e iNOS, respectivamente. A LYSO-7 foi capaz de alterar favoravelmente a atividade das enzimas antioxidantes no tecido gástrico. Ainda, a LYSO-7 diminuiu a área lesada e reduziu a concentração de TNFα e aumentou a de IL-10 no tecido gástrico lesado pela indometacina. Na resolução do processo inflamatório, o tratamento com LYSO-7 diminuiu a percentagem de área lesada, aumentou a apoptose de neutrófilos e a eferocitose de neutrófilos por

macrófagos peritoneais, inibiu a secreção de TNFα e aumentou a secreção de IL-10, TFG-1β e VEGF para o sobrenadante de macrófagos em fagocitose. A resolução de lesão gástrica, bem como a indução da fagocitose pela LYSO-7 foi reduzida em animais ANXA1$^{-/-}$. As investigações destes últimos dados mostraram a relação da ANXA1 e PPARγ, já que a expressão do receptor é reduzida em macrófagos obtidos de animais depletados de ANXA1. Os estudos toxicológicos mostraram que a LYSO-7 apresenta baixa toxicidade aguda e crônica *in vivo*, além de não ocasionar mutagenicidade em eritrócitos da medula óssea. Os dados obtidos mostram que a molécula LYSO-7 atua como agonista PPARγ na modulação da úlcera gástrica e modula a migração de neutrófilos e o fluxo sanguíneo na microcirculação. A transativação e transrepressão de eNOS e iNOS, respectivamente, o bloqueio da migração de neutrófilos para a lesão e a inibição da atividade de enzimas oxidativa, ativação de enzimas antioxidantes no epitélio gástrico e a inibição da secreção de mediadores inflamatórios parecem ser os mecanismos de ação da LYSO-7 na citoproteção gástrica. Adicionalmente, a LYSO-7 atua na resolução do processo inflamatório promovendo *downregulation* na secreção de mediadores inflamatórios, aumento na apoptose de neutrófilos e eferocitose de neutrófilos apoptóticos.

Palavras chave: microscopia intravital, GW9962, L-NAME, anticorpo anti-granulócito, óxido nítrico sintase endotelial, anexina A1.

ABSTRACT

SANTIN, J. R. **Effect of PPAR agonist LYSO-7 on installation and healing of gastric ulcers induced in mice.** 2013. 104p. Thesis (Doctoral) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

Gastric ulcer is a chronic disease that presents high prevalence, and effectiveness of pharmacological treatments available is limited by several adverse effects. In this study is shown the mechanism of action and toxicological effects of the molecule indole-thiazolidine LYSO-7 in different models of gastric ulcer. Male Swiss mice were treated with vehicle LYSO-7 (5, 25, or 50 mg/kg, p.o.) or bezafibrate (25 or 50 mg/kg, p.o.) 1 hour before the oral administration of Et/HCl (60%/0.03 M) or indomethacin (100 mg/kg). In another set of assays, animals were pre-treated with GW9962, a PPARγ antagonist (2 mg/kg, i.p.), anti-granulocyte antibody (50 µL, i.p.) or L-NAME (70 mg/kg, i.p.) 1 hour before the treatment with vehicle or LYSO-7. One hour after administration of the Et/HCl solution, neutrophils were quantified in the blood and bone marrow, the gastric microcirculatory network was studied *in situ* by intravital microscopy, in the gastric tissue were quantified the percentage of injured area, MPO activity, PPARγ gene and protein expression, iNOS and eNOS protein expression, and catalase, SOD, GPx, GR and GST activity. One hour after indomethacin administration, gastric tissue was removed to verify the efficacy of LYSO-7 on inflammatory mediator secretion. Chronic ulcer assay induced by acetic acid was carried out in Balb/c WT or ANXA1$^{-/-}$, applying 20µL of acetic acid in the subserosal layer of the stomach and 24 hours after induction, animals were treated during seven days, once a day, with LYSO-7 (50 mg/kg), bezafibrate (50 mg/kg) or vehicle. Assays were performed with macrophages recruited to the peritoneum by sodium thioglycollate (3%, i.p.) and neutrophils by oyster glycogen (1%, i.p.). Acute and chronic toxicological and mutagenicity assays were also conducted. The results obtained show that LYSO-7 treatment decrease the injured area, neutrophil influx and microcirculatory stasis evoked by Et/HCl administration. Protective effects were reversed in animals pretreated with GW9962, indicating the involvement of PPARγ. Neutrophil influx is a determinant of the gastric lesion, once the depletion of these cells decreased the gastric damage, indicating that in the neutrophil mobilization blockade from the bone marrow to blood and to injured tissue may be a gastroprotective mechanism of LYSO-7. The vascular stasis reversion in the microcirculation is mediated by NO, but not the neutrophil influx, since the pretreatment with L-NAME abolished the effects of LYSO-7 on blood flow. This effect was dependent on increase and decrease of eNOS and iNOS protein expression, respectively. LYSO-7 positively altered the activity of antioxidant enzymes in the gastric tissue. Furthermore, LYSO-7 reduced the injured area and the concentration of TNFα and increased IL-10 in the gastric tissue in the indomethacin-induced ulcer model. In the resolution of inflammation, LYSO-7 treatment decreased the percentage of the injured area, increased the neutrophils apoptosis and the efferocytosis of apoptotic neutrophils by peritoneal macrophages, inhibited the TNFα release and increased the secretion of IL-10, IL-1β and VEGF in the supernatant of phagocytosis assay. The resolution of gastric lesions, as well as, the induction of phagocytosis by LYSO-7 was reduced in animals ANXA1$^{-/-}$. This data shown the relation of PPARγ and ANXA1, as PPARγ expression is reduced in macrophages obtained from ANXA1$^{-/-}$ animals. Toxicological studies showed that LYSO-7 has low

acute and chronic toxicity *in vivo*, and did not cause mutagenicity in bone marrow erythrocytes. The data obtained show that LYSO-7 acts as PPARγ in the modulation of gastric ulcer and modulate neutrophil migration and blood flow in the microcirculation. The transactivation and transrepression of eNOS and iNOS, respectively, blocking the neutrophil influx into the injury, antioxidant enzymes activation in the gastric epithelium and inhibition of inflammatory mediators release seem to be the mechanisms action of LYSO-7 in gastric cytoprotection. Additionally, LYSO-7 operates in the resolution of inflammation promoting downregulation in the secretion of inflammatory mediators and increases the neutrophil apoptosis and efferocytosis of apoptotic neutrophils.

Keywords: intravital microscopy, GW9962, L-NAME, anti-granulocyte antibody, endothelial nitric oxide synthase, annexin A1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visualização anatômica do estômago. 19
Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos de secreção de ácido gástrico pelo estômago. 20
Figura 3. Imagem ilustrativa do processo de resolução da inflamação. 24
Figura 4. Ativação transcricional de PPARs 32
Figura 5. Estrutura química do composto LYSO-7 35
Figura 6. Efeitos do tratamento oral com veículo, bezafibrato ou LYSO-7 no modelo de úlcera gástrica aguda induzida por Et/HCl. 50
Figura 7. Participação do receptor PPARγ no efeito protetor do composto LYSO-7 no modelo de úlcera aguda induzida por Et/HCl em camundongos.....51
Figura 8. Efeitos do tratamento com LYSO-7 sobre a expressão proteica e gênica de PPARγ no tecido gástrico. 52
Figura 9. Participação dos neutrófilos no dano gástrico provocado pela solução de Et/HCl. 54
Figura 10. Efeitos da LYSO-7 sobre o tráfego de neutrófilos na vigência de úlcera aguda induzida por Et/HCl em camundongos. 55
Figura 11. Efeitos da LYSO-7 sobre o fluxo sanguíneo da microcirculação no tecido gástrico após administração de Et/HCl. 57
Figura 12. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a expressão da NOS em animais submetidos ao ensaio de úlcera aguda induzida por Et/HCl. 58
Figura 13. Efeito do composto LYSO-7 sobre atividade enzimática no estômago de animais submetidos ao ensaio de úlcera aguda induzida por Et/HCl. 59
Figura 14. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a atividade enzimática no estômago de animais submetidos à úlcera aguda induzida por Et/HCl. 60
Figura 15. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a úlcera aguda induzida por indometacina. 61
Figura 16. Efeitos do composto LYSO-7 na resolução da úlcera crônica induzida por ácido acético. 62
Figura 17. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a apoptose de neutrófilos 63
Figura 18. Efeitos da LYSO-7 sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos.....64

Figura 19. Efeitos da LYSO-7 sobre a secreção de mediadores químicos por macrófagos peritoneais na vigência de fagocitose de neutrófilos apoptóticos. 65
Figura 20. Efeitos da LYSO-7 na expressão de CD36 em macrófagos.....66
Figura 21. Expressão proteica de ANXA1 e PPARγ em macrófagos. 67
Figura 22. Variação de peso em animais submetidos ao ensaio de toxicologia aguda dose-fixa.....68
Figura 23. Variação de peso acumulado em animais tratados durante 28 dias com veículo, pioglitazona ou LYSO-7. 69
Figura 24. Variação na glicose pós-prandial de animais submetidos ao ensaio toxicológico de doses repetidas. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do tratamento com omeprazol e LYSO-7 sobre os parâmetros de secreção gástrica obtidos em animais com ligadura de piloro. 53
Tabela 2. Parâmetros hematológicos relacionadas à classe eritrocitária em animais submetidos ao ensaio toxicológico crônico de doses-repetidas. 71
Tabela 3. Parâmetros hematológicos relacionados à classe leucocitária em animais submetidos ao ensaio toxicológico crônico de doses-repetidas. 71
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de animais submetidos ao ensaio toxicológico crônico de doses-repetidas. 72
Tabela 5. Percentagem de eritrócitos policromáticos (EPC) micronúcleos (EPCMN) no teste de micronúcleos realizado com LYSO-7 e pioglitazona.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatório não esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
ANXA1	Anexina A1
AP-1	Proteína ativadora-1
CBA	*Cytometric Bead Array*
CCK2	Receptor de colecistocinina-2
CEUA	Comitê de ética de uso de animais
CMC	Carboximetilcelulose
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
ECAM-1	Molécula de adesão de célula endotelial-1
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Et/HCl	Etanol/Ácido clorídrico
FPR2	Receptor de peptídeos formilados
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GST	Glutationa transferase
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL-1β	Interleucina 1beta
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
L-NAME	N (G)-nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitogênos
MMS	Metil metano sulfonato
MPO	Mieloperoxidase

NFκB	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NOS	Óxido nítrico sintase
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina I2
PGJ2	Prostaglandina J2
PPAR	Receptor proliferador de peroxissoma
PPRE	Elemento responsivo aos proliferadores de peroxissoma
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor retinóide X
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição-1
TGF-1β	Fator de transformação do crescimento-1Beta
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
WT	*Wild type* (animal selvagem)
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Fisiopatologia da úlcera gástrica 19
1.2 Tratamento 28
1.3 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) 29
1.4 LYSO-7 35
2 OBJETIVOS 37
3 MATERIAIS E MÉTODOS 38
3.1 Animais 38
3.2 Úlcera gástrica induzida por etanol/HCl 38
3.3 Histologia 39
3.4 Avaliação da atividade PPARγ do composto LYSO-7 39
3.5 Microscopia intravital 39
3.6 Atividade da enzima mieloperoxidase no estômago 40
3.7 Parâmetros citológicos – Sangue e Medula óssea 40
3.8 Depleção de neutrófilos circulantes 41
3.9 Quantificação da expressão proteica de iNOS, eNOS e PPARγ 41
3.10 Expressão gênica de PPARγ 42
3.11 Atividade das enzimas antioxidantes no estômago 43
3.11.1 Determinação da atividade da Glutationa peroxidase (GPx) 43
3.11.2 Determinação da atividade da Glutationa Redutase (GR) 43
3.11.3 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) 43
3.11.4 Determinação da atividade da Catalase (CAT) 43
3.12 Úlcera aguda induzida por indometacina 44
3.13 Parâmetros de secreção gástrica 44
3.14 Úlcera crônica induzida por ácido acético 45
3.15 Viabilidade 45
3.16 Ensaio de Fagocitose e liberação de mediadores 46
3.17 Expressão de CD36 em macrófagos 46
3.18 Expressão proteica de ANXA1 e PPARγ em macrófagos 47
3.19 Ensaios toxicológicos 48
3.19.1 Ensaio toxicológico agudo: dose-fixa 48
3.19.2 Ensaio toxicológico crônico: Doses repetidas 48

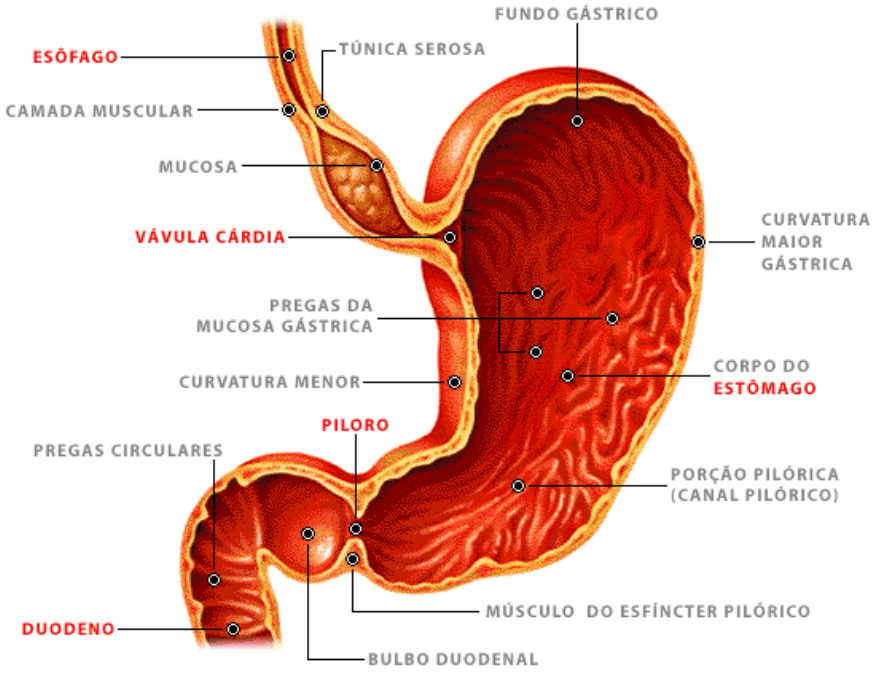
3.19.3 Ensaio Micronúcleo.....49
3.20 Análise Estatística.....49
4 RESULTADOS.....50
4.1 LYSO-7 protege o tecido gástrico dos danos provocados pela administração de Et/HCl.....50
4.2 O tratamento *in vivo* com LYSO-7 aumenta a expressão gênica e proteica de PPARγ no tecido gástrico.....51
4.3 LYSO-7 não interfere nos parâmetros de secreção gástrica 52
4.4 LYSO-7 inibe a migração de neutrófilos para o tecido gástrico 53
4.5 LYSO-7 reverte a estase do fluxo sanguíneo no tecido gástrico induzido por Et/HCl. Efeito mediado pelo NO.....56
4.6 LYSO-7 modifica o perfil das enzimas do sistema antioxidante.....59
4.7 LYSO-7 inibe a lesão induzida pela administração aguda de indometacina....60
4.8 LYSO-7 diminui a área lesada no modelo de úlcera crônica 61
4.9 LYSO-7 induz a apoptose de neutrófilos.....63
4.10 LYSO-7 aumenta a fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Efeito dependente de ANXA1 63
4.11 LYSO-7 diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a liberação de citocinas pro-resolutórias.....65
4.12 O efeito da LYSO-7 sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos não é dependente de CD36 66
4.13 Efeitos da LYSO-7 sobre a expressão proteica de ANXA1 e PPARγ em macrófagos 66
4.14 LYSO-7 não provoca alterações toxicológicas agudas.....67
4.15 LYSO-7 não provoca alterações no modelo de toxicologia crônica de doses-repetidas 68
4.16 LYSO-7 não provoca efeitos mutagênicos em eritrócitos policromáticos da medula óssea.....73
5 DISCUSSÃO 74
6 CONCLUSÕES.....84
REFERÊNCIAS.....86
ANEXOS 105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fisiopatologia da úlcera gástrica

O trato gastrointestinal tem como principal função a digestão e a absorção de nutrientes, a fim de manter o funcionamento do organismo. Um dos segmentos do trato digestório é o estômago, este órgão é composto por várias camadas de musculo liso, sendo a luz do estômago recoberta por uma camada de muco. Anatomicamente o estômago é dividido em quatro regiões: a) cárdia: região próxima à junção esofagogástrica; b) fundo: região bulbosa subdiafragmática do estômago, localizado à esquerda do esôfago, em direção cefálica à entrada do esôfago para o estômago; c) corpo: maior região anatômica interposta entre o fundo e o antro; d) antro ou porção pilórica: se estende desde o corpo do estômago até o esfíncter pilórico (Figura 1) (CRAWFORD, 2000; MERCHANT, 2007; SCHUBERT & PEURA, 2008).

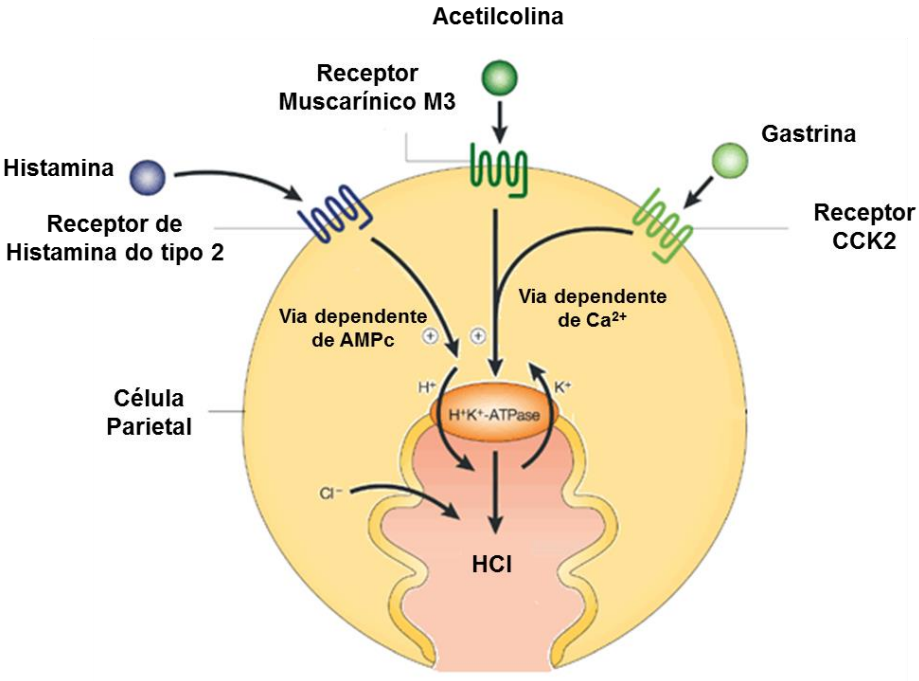
Figura 1. Visualização anatômica do estômago.



Fonte: Enciclopédia do corpo humano, 2000.

No corpo e antro do estômago estão localizadas as glândulas gástricas que compõem as células parietais. As células parietais desempenham a importante função de produzir e secretar ácido gástrico, responsável pela digestão de proteínas, absorção de ferro, cálcio e vitamina B12. Os principais estimulantes da secreção de ácido pelas células parietais são a histamina, gastrina e acetilcolina (Figura 2) (BITZIOU & PATEL, 2012). A histamina, secretada a partir das células enterocromafins da mucosa, difunde-se para as células parietais e interage com os receptores de histamina do tipo 2 promovendo a secreção de ácido gástrico (BITZIOU & PATEL, 2012; ZHAO & CHEN, 2012). A gastrina, liberada a partir de células G do antro gástrico, entra na corrente sanguínea até atingir os receptores CCK2 nas células parietais, estimulado a secreção de HCl, aumentando indiretamente a secreção de pepsinogênio, estimulando o fluxo sanguíneo e a motilidade gástrica. A gastrina também é responsável pelo crescimento de células gástricas, as quais são responsáveis pela manutenção da integridade do tecido estomacal (COCKBURN et al., 2013). A acetilcolina, liberada por neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso entérico, estimula a célula parietal através de receptores muscarínicos M3 (POMMIER et al., 2003; CHU & SCHUBERT 2013).

Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos de secreção de ácido gástrico pelo estômago.



Fonte: Adaptado de Olbe et al.(2003).

Ainda, as células do epitélio gástrico são responsáveis pela secreção de muco e íons bicarbonato, os quais juntos formam uma barreira que tem a função de proteger o lúmen estomacal contra a ação do ácido gástrico (HOLT & HOLLANDER, 1986; HAM & KAUNITZ, 2007). No entanto, esta barreira tem capacidade limitada para proteger a mucosa do acido, pepsina e de danos mecânicos. É composta por um gel com característica elástica, viscosa e aderente que proporciona um ambiente com pH próximo a neutralidade. Ainda, o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica desempenha papel importante na remoção de ácido e fornecimento de bicarbonato (KAUNITZ & AKIBA, 2006; HAM & KAUNITZ, 2007).

Frente às ações fisiológicas do estômago, modificações na estrutura tecidual e nas funções celulares levam a prejuízos sérios na homeostasia. A úlcera péptica é uma das enfermidades mais comuns do estômago, sendo definida como uma lesão crônica, que penetra a camada de muco e muscular formando uma cavidade. As úlceras pépticas podem ocorrer em qualquer região do trato gastrointestinal exposto à ação agressiva do ácido clorídrico. No entanto, a localização mais frequente destas lesões é no estômago e no duodeno. As lesões estomacais geralmente se instalam ao longo da pequena curvatura na zona de transição entre o corpo e o antro (MALFERTHEINER et al., 2009; NAJM, 2011).

A úlcera péptica tem como principal manifestação clinica a dor epigástrica localizada, que é aliviada pela ingestão de alimentos, antiácidos ou agentes antissecretores. No entanto, a úlcera péptica apresenta outros sintomas típicos, como a sensação maçante ou episódica de queimação, chamada dispepsia que é caracterizada pelo aumento da secreção ácida, que acomete cerca de 80 a 90% dos pacientes (RAMAKRISHMAN & SALINAS 2007; BARKUN & LEONTIADIS 2010). Outro sintoma corrente é a gastrite, que compreende a inflamação do revestimento do estômago, podendo ser aguda ou crônica, que pode evoluir para um quadro ulcerativo (LIPOF et al., 2006; MAHADEVA & GOH, 2006). Porém, a complicação mais grave da úlcera péptica é a hemorragia, relatada por 170 a cada 100.000 pacientes, com maior risco em pessoas com idade superior a 60 anos. A perfuração do estômago é menos frequente do que a hemorragia (ROCKALL et al., 1995; BLATCHFORD et al., 1997; MALFERTHEINER et al., 2009), no entanto, quando ocorre é classificada como doença de extrema gravidade. Muitos pacientes não manifestam nenhum dos sintomas relatados acima (HILTON et al., 2001, LU et al., 2004). Apesar dos sintomas descritos acima causarem morbidade e em casos

extremos mortalidade, deve-se considerar que úlcera gástrica pode ser um fator indutor de câncer gástrico. Um estudo recente mostrou que o principal fator indutor de câncer gástrico é a infecção por *Helicobacter pylori*, bactéria que coloniza a mucosa do estômago e evoca uma inflamação crônica, na qual a intensidade determina a evolução da doença (FERRER-FERRER et al., 2013).

Dados epidemiológicos evidenciam que a úlcera gástrica é uma doença cada vez mais comum na população mundial. Cerca de 10% da população dos países industrializados é afetada, sendo que só no continente americano mais de dois milhões de adultos apresentam a doença (HEIN et al., 1997; EHLIN et al., 2003). Nos EUA, mais de 300 mil casos são diagnosticados a cada ano e, na Coréia do Sul, um estudo realizado em 2005 revelou que 20% de todos os adultos que foram atendidos em uma unidade de saúde sofriam de úlcera gástrica (OVERMIER & MOURISON, 2013). Interessantemente, a úlcera gástrica acomete maior proporção de homens (10 a 20%) que mulheres (8 a 11%) (NAIK et al., 2007). No entanto, durante a menopausa mulheres passam a ter maior propensão a úlceras gástricas devido a menor secreção de hormônios. Também pacientes idosos apresentam probabilidade maior de apresentarem lesões devido ao alto consumo de medicamentos bem como redução no número de receptores.

A etiologia das lesões gástricas ulcerativas ainda não está completamente elucidada, no entanto, sabe-se que a gênese da úlcera é multifatorial, dependendo de alterações endógenas e de estímulos exógenos, visto que o trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Dentre os fatores exógenos, destaca-se: 1) Os AINEs, os quais estão entre o grupo de medicamentos mais prescritos no mundo. Estes medicamentos provocam sérios efeitos adversos, especialmente no estômago (HAWKEY, 2000; TARGOWNIK et al., 2008). Os AINEs provocam uma redução na biossíntese de PGE2 por meio da inibição da COX-1, que é a responsável pela secreção de muco, liberação de bicarbonato e também pelo fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, que associados, leva a formação de lesões gástricas (VANE & BOTTING, 1999). 2) o consumo excessivo de álcool, que promove distúrbios na mucosa (HIRUMA-LIMA et al., 2009). O etanol exerce efeito tóxico direto sobre o epitélio, que conduz à formação de lesões necróticas características, devido à redução na produção de muco e de secreção de bicarbonato (MASSIGNANI et al., 2009). O etanol também provoca redução do fluxo sanguíneo gástrico, solubilização dos componentes da mucosa do

estômago, indução de estresse oxidativo, aumento da atividade da xantina oxidase, aumento nos níveis de malondialdeído, e diminuição nos níveis de glutationa peroxidade, redutase e transferase (MARROTA et al., 1999). 3) Infecção por *H. pylori*, um bacilo microaerofílico espiral não invasivo gram-negativo que tem a capacidade de colonizar a mucosa gástrica. O *H. pylori* é encontrado em mais de 50% da população mundial, sendo mais prevalente nos países em desenvolvimento (80%). Esta estatística reflete a diferença de práticas de saúde pública entre os países desenvolvidos e não desenvolvidos, como saneamento básico e, possivelmente, ao maior acesso ao uso de antibióticos (USTUN et al., 2006; MALFERTHEINER et al., 2000). A bactéria *H. pylori* induz inflamação gástrica, estresse oxidativo, dano ao DNA, apoptose das células epiteliais e induz uma desregulação do ciclo celular (LEE et al., 2004).

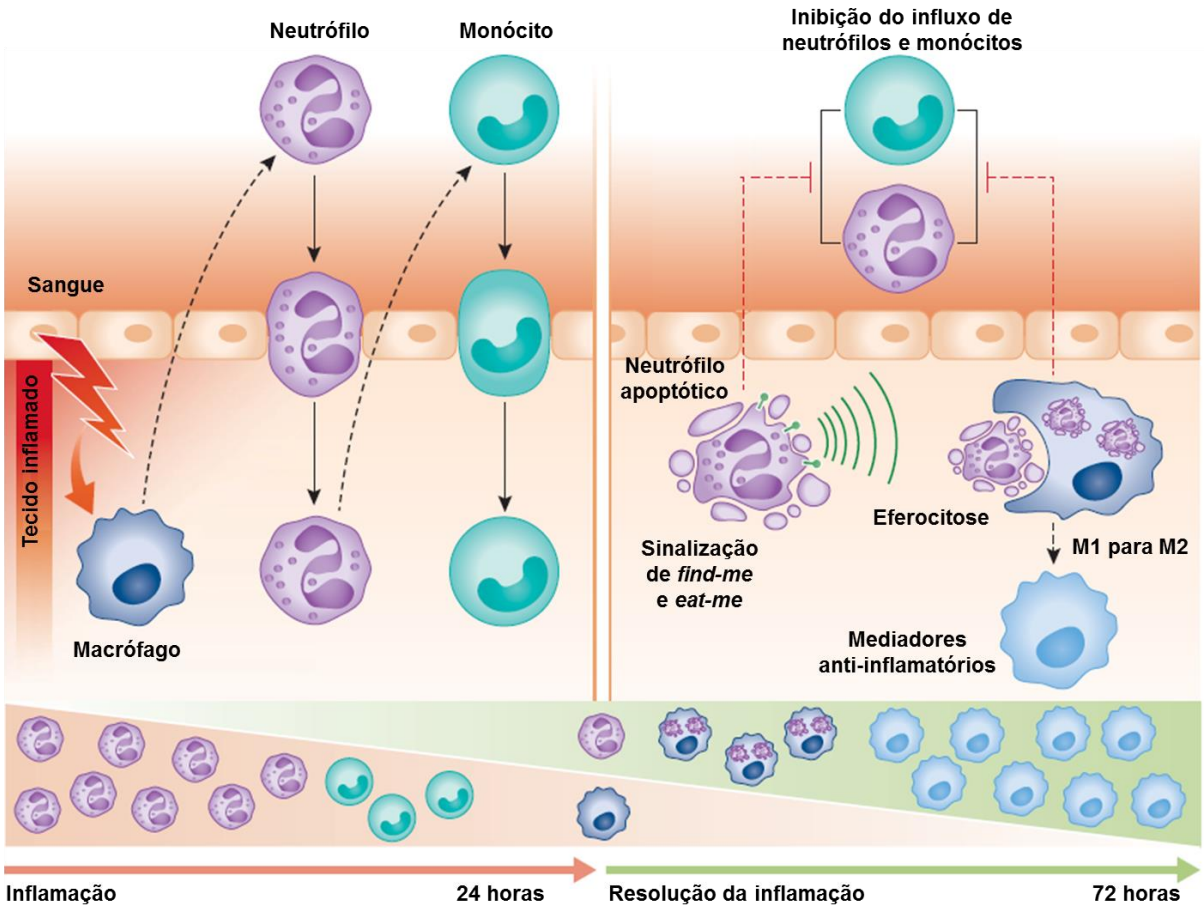
Os fatores endógenos indutores da lesão gástrica compreendem doenças associadas ou alterações da mucosa provocadas por estresse, que resultam na hipersecreção gástrica. A reação de estresse e mediada por duas vias distintas, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e o sistema simpatoadrenal (SAAVEDRA et al., 2011) os quais, durante condições de estresse são alterados, levando a aumento na secreção de ácido gástrico, pepsina, alterações na liberação de glicocorticoides, catecolaminas, na microcirculação do tecido gástrico, que, associados, podem causar quadros de isquemia gerando necrose tecidual e o surgimento de úlceras gástricas. Entre as doenças, destaca-se a síndrome de Zollinger-Ellison, caracterizada por tumor secretor do hormônio gastrina (gastrinoma), que causa hipersecreção de ácido gástrico, com consequente dano ao epitélio gerando lesões (WILCOX & HIRSCHOWITZ, 2009).

Independente do fator indutor, a úlcera gástrica é resultante do desequilíbrio entre a produção de ácido gástrico e os fatores fisiológicos de proteção desencadeados pelas células do trato gastrointestinal. O processo resultante é caracterizado pela necrose das células epiteliais e inflamação local, com intensa migração de leucócitos para o foco inflamatório. Os neutrófilos circulantes são os primeiros leucócitos a alcançarem o local da lesão e, subsequentemente, induzem a resposta inflamatória inata (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). No local da lesão, os neutrófilos secretam mediadores químicos, a fim de contribuir para a destruição do agente lesivo. No entanto, neste processo, em especial nos de longa duração, os neutrófilos secretam e liberam uma variedade de agentes químicos que contribuem

para a lesão tecidual (GREEN et al., 2003, 2004; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Assim, o *clearance* e o bloqueio na migração de neutrófilos para o tecido gástrico é um fator importante na resolução do processo inflamatório (ALESSANDRI et al., 2013).

A resolução do processo inflamatório possui mediadores, receptores e vias de ativação própria, que diferem dos processos de indução da inflamação (SERHAN et al., 2005; SERHAN et al., 2007; NATHAN & DING, 2010; RECCHIUTI, 2013). Atualmente, a resolução do processo inflamatório é divida em três diferentes fases, a saber: *downregulation* na sinalização pró-inflamatória, apoptose de leucócitos e a fagocitose de leucócitos apoptóticos por macrófagos teciduais (eferocitose), seguida da migração para os linfonodos (Figura 3) (LEE & SURH, 2012).

Figura 3. Imagem ilustrativa do processo de resolução da inflamação.



Fonte: Adaptado de Ortega-Gómez et al. (2013).

A fase inicial da resolução envolve a supressão da sinalização pró-inflamatória e a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, TGF-1β, enzimas proteolíticas e mediadores lipídicos por células residentes e macrófagos. A supressão visa inibir o influxo de neutrófilos, que é pré-requisito para a resolução da inflamação (LEE & SURTH, 2012). No entanto, a inibição no recrutamento de neutrófilos é somente uma das etapas necessárias para o retorno da homeostasia tecidual, sendo necessários, ainda, a efetiva apoptose de neutrófilos e o *clearance* destes por macrófagos residentes para a finalização do processo inflamatório (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). Interessantemente, os neutrófilos em processos de apoptose atenuam a inflamação por diferentes mecanismos, sendo relevante o *switch* na produção de mediadores pró para anti-inflamatórios, que interferem negativamente para a migração de neutrófilos. Neste contexto, os neutrófilos secretam a proteína ANXA1 (37 kDa), que se liga com alta afinidade em fosfolipídios na presença de Ca^{++} (RAYNAL & POLLARD, 1994). A síntese da ANXA1 é regulada principalmente pelos glicocorticóides, sendo uma importante proteína na ação anti-inflamatória dos glicocorticóides sintéticos e endógenos (WEIN et al., 2004; SOLITO et al., 2006; PERRETTI & D`ÁQUISICTO, 2009). Em condições basais, ANXA1 é encontrada no citoplasma de neutrófilos, macrófagos e monócitos de humanos e de murinos. Em condições de ativação celular, a ANXA1 é rapidamente deslocada do citoplasma para a membrana, é secretada (PERRETTI et al., 1996; VONG et al., 2007) e liga-se a um receptor de sete domínios transmembrana acoplado a proteína G, o FPR2. A atuação da ANXA1 está relacionada com a sua capacidade de interagir com as membranas celulares, principalmente por mecanismo justácrino, e esta interação é reversível e regulada especialmente por modificações pós-translacionais, como a fosforilação, principalmente, da porção N-terminal (SCHLAEPFER & HAIGLER, 1987). A interação da ANXA1 com o receptor FPR2 e importante na resolução do processo inflamatório modulando a adesão e migração de leucócitos, além de promover a apoptose de neutrófilos e o *clearance* destes por macrófagos (PERRETTI et al., 2002; PERRETTI & SOLITO, 2004; SCANNELL et al., 2007; DALLI et al., 2008; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). A lactoferrina, outra importante proteína que esta contida dentro de grânulos secundários de neutrófilos, apresenta efeitos similares aos da ANXA1, pois quando liberada, liga-se a receptores específicos, inibindo a sinalização intracelular da MAPK, a qual é crucial para o processo de adesão dos leucócitos ao endotélio (BOURNAZOU et al., 2009).

Durante o processo de apoptose ocorrem alterações na expressão de moléculas na superfície de células em processo de morte, sendo estas alterações responsáveis pelo reconhecimento das mesmas por fagócitos (FADOK et al., 1998; GARDAI et al., 2006; GREGORY & POUND, 2010). Neutrófilos apoptóticos passam a expressar sinais de *find me* e *eat me*. As sinalizações de *find me* são fatores secretados pelo neutrófilo que atraem *scavengers*. Quatro sinais de *find me* estão bem descritos na literatura, sendo estes a lisofosfatidilcolina, esfingosideo 1-fosfato, fracktalkina e os nucleotídeos ATP e UTP (ELLIOTT et al., 2009; GUDE et al., 2008; LAUBER et al., 2003; TRUMAN et al., 2008). As sinalizações de *eat me* são marcadores de superfície que permitem a identificação da célula em apoptose. São moléculas expostas na membrana da célula ou que sofrem modificações durante apoptose, como por exemplo, os peptídeos derivados do domínio N-terminal da ANXA1 (BLUME et al., 2012). O mais conhecido e descrito sinal de *eat me* é a fosfatidilserina. Assim, a interação entre os sinais de *eat me* nas células apoptóticas aos receptores nos macrófagos levam a firme adesão celular e a subsequente ativação das vias de fagocitose. Em conjunto, estes eventos asseguram que as células apoptóticas sejam eficientemente removidas do tecido, antes da ruptura de membranas com a liberação de mediadores citotóxicos, minimizando danos aos tecidos e evitando a perpetuação da resposta inflamatória (ALESSANDRI et al., 2013).

Os macrófagos, responsáveis pelo *clearance* de neutrófilos apoptóticos, são células que possuem importante plasticidade funcional e fenotípica, que se torna aparente durante a fase de resolução do processo inflamatório (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). Após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, ocorre a inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores lipídicos, com concomitante aumento na transcrição de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos, que se caracteriza principalmente pela liberação de IL-10, TGF-1β e VEGF (FADOK et al., 1998). A liberação destes mediadores é extremamente importante para o retorno da homeostasia e também para o reparo tecidual. A IL-10 é uma citocina pluripotente considerada a mais importante na resposta imune, é secretada pela maioria das células do sistema imune intato e adaptativo, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células *natural killer*, eosinófilos, neutrófilos, entre outras. Animais deficientes de IL-10 apresentam resposta imune prolongada e exacerbada, que em muitos casos e acompanhada por inflamação excessiva e dano tecidual.

Assim a secreção deste mediador é extremamente importante para o retorno da homeostasia em um processo inflamatório (NG et al., 2013; MARLOW et al., 2013). O TGF-1β é responsável por promover a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, induzir a expressão de inibidores de metaloproteinases que regulam o remodelamento da matriz extracelular e induzir a síntese de colágeno. Já o VEGF exerce um papel importante na cicatrização tecidual, e neste caso também da mucosa gástrica, pois a remissão da úlcera gástrica é altamente dependente de angiogênese. Foi demonstrado que a administração de um plasmídeo codificado para VEGF aumentou a angiogênese e acelerou a cicatrização; no entanto a administração de anticorpo anti-VEGF aboliu este efeito (JONES et al., 2001; OHNO et al., 2008; SATO et al., 2013).

O ácido gástrico por muito tempo foi considerado somente um agente necrotizante, no entanto, tem sido relatado que a exposição moderada ao ácido gástrico pode originar lesões gástricas via produção de ânion superóxido mitocondrial, atuando como um indutor do estresse oxidativo (NAGANO et al., 2012; TAMURA et al., 2013). O estresse oxidativo é definido como uma perturbação da homeostasia oxidante-antioxidante e este desequilíbrio leva a formação de espécies reativas de oxigênio, sendo as principais o ânion superóxido e o radical hidroxila, potentes agentes citotóxicos (OCK et al., 2012). Ainda, as espécies reativas formadas a partir da ação do ácido gástrico podem alterar vias de sinalização como a MAPK, NFκB e STAT3 (SOUZA et al., 2002; ABDEL-LATIF et al., 2004; DVORAK et al., 2007; TAMURA et al., 2013).

Ainda, quando as barreiras físicas de defesa são transpostas, mecanismos complexos de proteção epitelial e subepitelial são ativados, na tentativa de reduzir o estresse oxidativo (DONG & KAUNITZ, 2006). Esses mecanismos são constituídos por enzimas antioxidantes, como a SOD, catalase e pequenas moléculas como a glutationa, que tem como função transformar as espécies reativas em moléculas menos reativas como água e oxigênio (DRÖGE, 2002). A SOD é a principal enzima antioxidante, sua participação na redução do estresse oxidativo está relacionada a catalisação da dismutação do ânion superóxido em peroxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Embora o peroxido de hidrogênio não seja um radical, pode causar danos celulares graves, devido à geração de radicais hidroxil através da reação de Fenton. Os radicais hidroxil são altamente agressivos e levam a oxidação de macromoléculas. Portanto, o peróxido de hidrogênio deve ser rapidamente

convertido em água pelas enzimas catalase, GPx e GR, evitando assim o surgimento de lesões celulares (BAYIR, 2006; SCHÄFER & WERNER, 2008).

Além da inibição do potencial oxidativo, as células epiteliais do tecido gástrico secretam importantes mediadores como a PGI2 e, principalmente, a PGE2. O reparo tecidual da úlcera gástrica é um processo ativo e complexo que envolve a reconstrução da mucosa e do tecido, formação de novas vênulas e o reestabelecimento da arquiteta glandular (PERINI et al., 2003). As prostaglandinas geradas especialmente nas margens da úlcera gástrica pela COX-2 parecem desempenhar um papel crucial na cicatrização da úlcera por desencadear proliferação de células, angiogênese e restauração da integridade da mucosa. Já a COX-1, que é expressa constitutivamente na mucosa gástrica tem como função produzir prostaglandinas que atuam promovendo a secreção de muco e bicarbonato, e na regulação do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (BRZOZOWSKI, 2003; TULASSAY & HERSZENYI, 2010). A secreção de prostaglandina, em associação à produção de NO pelas células epiteliais, além de inibirem a produção do ácido gástrico, favorecem a manutenção da integridade tecidual e a rede microcirculatória e, consequentemente, a perfeita perfusão sanguínea. Em conjunto, estes fatores contribuem para evitar o dano das camadas epiteliais mais profundas da mucosa (GRANGER et al., 1994; WALLACE & MILLER, 2000).

Associados, os dados da literatura descritos acima mostram a complexidade da gênese da úlcera gástrica e que processos que facilitem a instalação ou que inibam a resolução da inflamação são fenômenos fundamentais para o desenvolvimento da lesão tecidual.

1.2 Tratamento

Por muitos anos a terapia antiúlcera foi baseada somente no uso de antiácidos, usados para neutralizar a secreção gástrica, restrição alimentar e procedimentos cirúrgicos. Atualmente, os principais fármacos utilizadas para tratar esta condição são os antagonistas dos receptores de histamina do tipo 2 (cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina) e inibidores da bomba de prótons H^+/K^+ ATPase (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e esomeprazol) (KUBECOVA et al., 2011; SHEEN & TRIADAFILOPOULOS, 2011). Os antagonistas de receptores de histamina do tipo 2, embora eficaz na cicatrização de úlceras gástricas, não são

capazes de evitar o aparecimento de úlceras recorrentes. Por esta razão começaram a ser utilizados, durante longos períodos, como terapia de manutenção. No entanto, após sete dias de tratamento é observada tolerância, seguida por redução de 50% na eficácia do tratamento (SACHS et al., 2007, 2010). Por outro lado, os inibidores da bomba de prótons não apresentam perda de eficiência e, por esta razão, são atualmente os medicamentos mais prescritos e utilizados no tratamento da úlcera gástrica. Porém, se usado por longos períodos, podem causar efeitos adversos, como hipersensibilidade, arritmia, impotência, ginecomastia e doenças hematopoiéticas, os quais inibem a adesão ao tratamento (SHEEN & TRIADAFILOPOULOS, 2011; ABRAHAM, 2012; DEEPINDER & BRAUNSTEIN, 2012).

1.3 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)

Os PPARs são receptores nucleares que pertencem à superfamília de receptores intracelulares hormonais que medeiam à transcrição gênica de fatores após sua ativação. Estruturalmente, os PPARs são semelhantes aos receptores para esteroides e receptores de hormônios tireoideanos (LAUDET et al., 1992; CHANG et al., 2007). A superfamília PPAR até o momento é composta por três isotipos: PPARα, NR1C1 (receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 1); PPARβ/δ, NUC ou NR1C2 (receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 2), ou simplesmente PPARδ; e PPARγ, NR1C3 (receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 3) (PATERNITI et al., 2012; AHMADIAN et al., 2013). O isotipo PPARα foi o primeiro a ser clonado em 1990 (ISSEMANN & GREEN, 1990); mais tarde, em 1992, Dreyer et al. (1992) clonaram juntamente com o PPARα mais duas isoformas PPARβ/δ e PPARγ.

A isoforma PPARα é expressa predominantemente no fígado, coração e tecido adiposo marrom (FRUCHART et al., 2001) e ainda em células endoteliais, monócitos, macrófagos e células T (SCHOONJANS et al., 1996; TORRA et al., 2001; ROSENSON et al., 2012). O PPARα desempenha múltiplas funções no organismo, mais notavelmente no perfil lipídico, onde provoca o aumento dos níveis de HDL, diminuição de triglicerídeos e ácidos graxos livres, e transformação de LDL em moléculas de alta densidade, que são menos aterogênicas (STAELS et al., 1995;

DESVERGNE et al., 2004; EVANS et al., 2004; PYPER et al., 2010; ROSENSON et al., 2012). Dados da literatura mostram que a ativação do receptor PPARα em células do musculo liso, células endoteliais e macrófagos, resulta em efeito anti-inflamatório que é mediado pela inibição do NFκB, da expressão de VCAM-1, e vias da AP-1, culminando com a redução dos níveis de proteína C reativa e IL-6 (STRAUSS & GLASS, 2007). Interessantemente, camundongos deficientes para PPARα apresentam resposta inflamatória estimulada com LTB4 prolongada (DEVCHAND et al., 1996). O receptor PPARα pode ser ativado, tanto por ligantes naturais que incluem as prostaglandinas, leucotrienos e derivados de ácido graxos, como o ácido eicosapentaenóico e doxosahexaenóico, como pelos ligantes sintéticos clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato e bezafibrato (SPENCER et al., 1997; BISHOP-BAILEY & BYSTROM, 2009).

A isoforma PPARβ/δ apresenta efeitos semelhantes à isoforma PPARα, é ubiquitariamente expresso no organismo e tem um papel crucial na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos, crescimento celular e gasto de energia (BRAISSANT et al., 1996; FREDENRICH & GRIMALDI, 2005). Adicionalmente, tem sido reportado que ligantes do receptor PPARβ/δ podem inibir a expressão de vários mediadores pro-inflamatórios, como TNFα, IL-1β, VCAM-1, PAF e COX-2 (PATERNITI et al., 2010). Os agonistas PPARβ/δ vêm sendo amplamente investigados como potenciais drogas para o tratamento de dislipidemias e obesidade. No entanto, até o momento nenhuma medicação que atue exclusivamente neste receptor foi aprovada para utilização (WAITES et al., 2007; TSENG & TSENG, 2012).

O PPARγ apresenta três diferentes formas, PPARγ1, PPARγ2 e PPARγ3 (MEDINA-GOMEZ et al., 2007; TONTONOZ & SPIEGELMAN, 2008). A forma PPARγ2 é exclusivamente expressa no tecido adiposo marrom e branco, já as demais isoformas apresentam maior distribuição no organismo, com expressão em macrófagos, osteoblastos, neutrófilos, células T, células endoteliais, células do musculo liso vascular, células tumorais, e em órgãos como próstata, mama e ovário (MEDINA-GOMEZ et al., 2007; SARAF et al., 2012; SANTIN et al., em anexo). Os agonistas PPARγ são conhecidos principalmente como sensibilizadores de insulina, no entanto, também apresentam atividade anti-inflamatória e antiaterogênica resultante da inibição de fatores de transcrição nuclear como o NFκB e AP-1

(STRAUSS & GLASS, 2007; CARIOU et al., 2012). Os principais ligantes para esta isoforma são as moléculas tiazolidínicas, que incluem: pioglitazona e rosiglitazona (XU et al., 1999; BERGER & MOLLER, 2002; KNOUFF & AUWERX, 2004).

Entretanto, existem alguns agonistas que tem capacidade de ativar simultaneamente duas isoformas, esse grupo de compostos é denominado de duplo-agonistas. Os derivados do glitazar compõem este grupo, pois ativam receptores PPARα e PPARγ, e são utilizados no tratamento de resistência a insulina e dislipidemia. No entanto, os efeitos aditivos, complementares ou sinérgicos ainda não foram completamente estabelecidos (TENENBAUM et al., 2005; BALAKUMAR et al., 2007). Os agonistas PPAR pan têm a capacidade de ativar todas as isoformas (α, β/δ e γ). A ativação PPAR pan amplifica os efeitos terapêuticos e reduz os efeitos adversos comuns em agonistas específicos, como por exemplo o ganho de peso e os riscos cardiovasculares (BALAKUMAR et al., 2007).

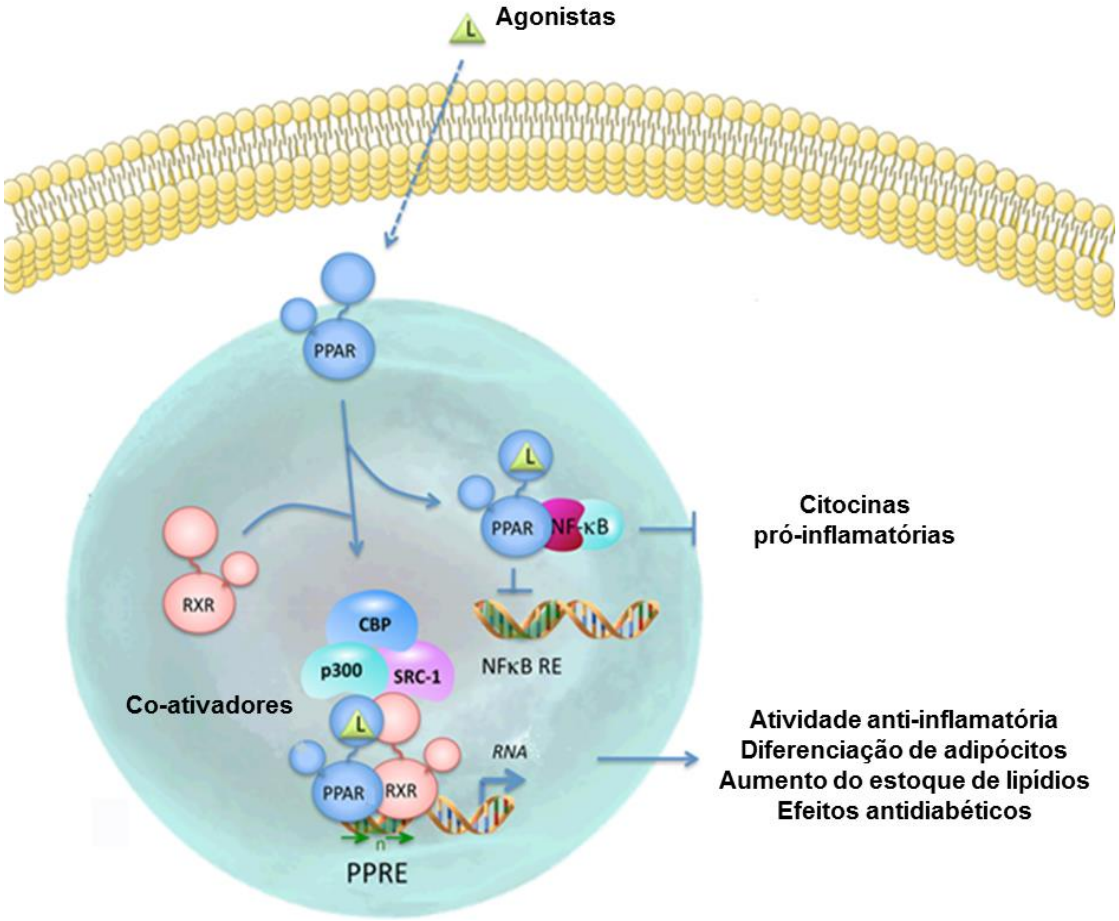
Os PPARs são ligantes de ativação de fatores de transcrição e exercem suas ações em diferentes tipos celulares, induzindo ou inibindo a expressão gênica de uma variedade de genes e, desta forma, estão envolvidos em uma diversidade de processos fisiopatológicos (BERGER & MOLLER, 2002; KOTA et al., 2005). Na expressão gênica, o PPAR forma um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR). A interação de proteínas é um fator regulador na atividade dos receptores PPARs, os quais nos seus estados inativados estão ligados a proteínas co-repressoras. Após a interação do ligante com o receptor PPAR ocorre à dissociação das proteínas co-repressoras e, sucessivamente, são recrutadas proteínas co-ativadoras, como a proteína ligante de PPAR e co-ativador de receptor de esteroide-1, que fazem a translocação do receptor PPAR do citoplasma para o núcleo. O heterodímero PPAR/RXR é associado a um complexo multiproteico, o qual se liga ao elemento PPRE no domínio promotor de genes alvos para estimular a transcrição da proteína (BERGER et al., 2005; CARIOU et al., 2012) (Figura 4).

Ainda, o complexo pode ativar ou inibir diretamente outra via de transcrição, independente de ligação aos PPREs (Figura 4) (COLLINO et al., 2008; BISCETTI et al., 2009). Dados da literatura mostram que agonistas PPARγ endógenos e sintéticos inibem a produção de NO, TNFα, IL-1 e IL-6 induzida pelo fMLP em monócitos e macrófagos e antagonizam a atividade de fatores transcricionais como NFκB, STAT e AP-1, de forma independente de ligação ao DNA (GIRI et al., 2004). Um estudo

mostrou que a PGJ2 inibe a ativação do fator nuclear NFκB em células HeLa, as quais não expressam o receptor PPARγ, confirmando que os agonistas PPARγ podem agir independentemente do receptor (STRAUS et al., 2000; RICHARD et al., 2007).

Inúmeros compostos endógenos são agonistas PPARs e se ligam a estes com diferentes afinidades e seletividade. Tem sido mostrado que os PPARs são ativados por ácidos graxos insaturados, como os ácidos palmíticos, oléicos, linoléicos e ácido araquidônico (BERGER & MOLLER, 2002); por derivados da PGD2 e PGJ2 (FORMAN et al., 1995); por alquil fosfolípides e eicosanóides (FORMAN et al., 1997; YU et al., 1995). A relevância fisiológica da ligação destes compostos endógenos tem sido discutida, mas há fortes evidências que os PPARs funcionem como sensores de ácidos graxos livres nos tecidos (BISCETTI et al., 2009).

Figura 4. Ativação transcricional de PPARs



Fonte: Adaptado de Kawai & Rosen (2010).

A literatura é bastante ampla quanto à ação de agonistas sintéticos de PPARs no tratamento de diversas doenças. O interesse pelo papel terapêutico dos agonistas PPARs teve início com o uso de fibratos e tiazolidinas, empregados para controlar a hiperglicemia e dislipidemia em pacientes diabéticos. Neste contexto, foi mostrada a capacidade da pioglitazona, um agonista PPARγ, pertencente à classe das tiazolidinas, de inibir o desenvolvimento de diabetes induzida por estreptozotocina em ratos (TAKAMURA et al., 1999). Resultados obtidos de estudos clínicos de fase II realizados com aleglitazar, um duplo agonista PPARα e β/δ, demonstraram diminuição da hiperglicemia e mudanças favoráveis no perfil lipídico (HDL e triglicerídeos), com perfil de segurança aceitável (CAVENDER & LINCOFF, 2009).

Tem sido amplamente demonstrado os efeitos anti-inflamatórios e antiaterosclerótico dos agonistas PPARs, o que tem sugerido seu uso clínico para tratamento de diferentes doenças de origem inflamatória (COLLINO et al., 2008; KALAITZIDIS et al., 2009; APRAHAMIAN et al., 2009; IHLE et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; LINCOFF et al., 2013; WANG et al., 2013). Neste contexto, foi mostrado que os agonistas PPARs inibem diferentes eventos do processo inflamatório a nível celular e vascular, como por exemplo, recrutamento de leucócitos para o foco de lesão, secreção de mediadores inflamatórios pelas diferentes células envolvidas no processo (BISHOP-BAILEY & BYSTROM, 2009). Ainda, a ativação PPAR ocasionada pela rosiglitazona é capaz de proteger o sistema nervoso central contra disfunções microvasculares ocasionadas pela sepse, como o número de leucócitos em comportamento *rolling*, aderidos e migrados para a área lesionada (ARAÚJO et al., 2012). Um estudo utilizando a PGJ2, um agonista PPARγ endógeno, mostrou que o efeito sobre a migração de neutrófilos é dependente da ativação da via do NO (NAPIMOGA et al., 2008). Estudos indicam, ainda, que os agonistas PPARs diminuem o estresse oxidativo (MICHALIK & WAHLI, 2006; ALESHIN & REISER, 2013), inibem ou induzem o processo de angiogênese (BISCETTI ET AL., 2009; KHAZAEI et al., 2012; RIZVI et al., 2013) e favorecem o processo de cicatrização tecidual (MICHALIK & WAHLI, 2006; LI et al., 2012; NAKAMURA et al., 2012).

Pelas atividades farmacológicas dos agonistas PPARs e com base na gênese do processo ulcerativo, tem sido proposto que estas moléculas possam ser úteis no tratamento da úlcera gástrica. Pathak et al. (2007) mostraram, em diferentes

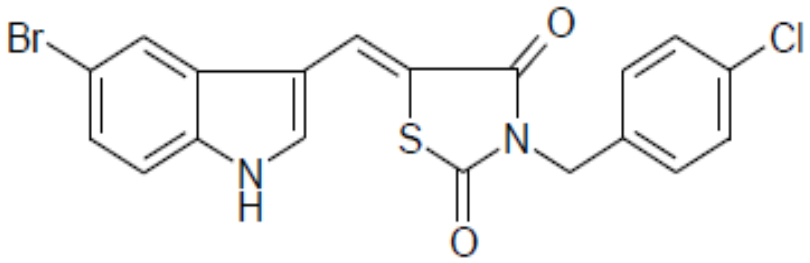
modelos experimentais de úlcera, que o bezafibrato, um agonista PPAR pan, impede o desenvolvimento da lesão ulcerativa induzida por etanol e promove a restauração do tecido gástrico em ratos submetidos à úlcera crônica induzida por ácido acético. Adicionalmente, Brzozowski et al. (2005) mostraram que o efeito gastroprotetor da pioglitazona, um agonista PPARγ, foi acompanhado de aumento no fluxo sanguíneo e da produção de PGE2, além de queda significativa nos níveis de TNFα e IL-1β. Especificamente no modelo de úlcera causada por ácido acético, o agonista PPARγ causou aceleração da cicatrização acompanhada por aumento na expressão da molécula de adesão CD31 (PECAM-1), relevante para cicatrização e revascularização.

A proposta que o efeito protetor sobre a mucosa gástrica pode estar relacionada às propriedades anti-inflamatórias dos PPARs tem sido reforçada em diferentes modelos experimentais. Foi demonstrado que a pioglitazona reduz a secreção local de mediadores pró-inflamatórios como, TNFα e IL-1β, decorrente da repressão da atividade do NFκB durante a cicatrização de úlceras crônicas induzidas por ácido acético (LAHIRI et al., 2009). Neste trabalho, também foi sugerido que o efeito da pioglitazona possa envolver a participação de receptores de glicocorticóides, pois ao utilizar tratamento farmacológico com o antagonista de receptor de glicocorticóide, RU38486, houve aumento significativo na expressão de TNFα e IL-1β. Ainda, ressalta-se que membros da família de receptores hormonais nucleares, como PPARγ e receptor de glicocorticóide, uma vez ativados por um agonista, podem interagir fisicamente e modularem a transcrição do mesmo gene alvo (NIE et al., 2005; IALENTI et al., 2005; LAHIRI et al., 2009). Recentemente, a atividade gastroprotetora do telmisartam, um agonista PPARγ, foi associado à sua ação antioxidante, evidenciada no experimento de úlcera induzida por indometacina (MORSY et al., 2009). Adicionalmente, a rosiglitazona, um forte agonista PPARγ, reduziu de maneira significativa a infiltração de neutrófilos e as concentrações de citocinas pro-inflamatórias, em lesões ulcerativas ocasionadas por isquemia e reperfusão (VILLEGAS et al. 2004). A literatura sobre a ação dos agonistas PPARs sobre a úlcera gástrica ainda é restrita, no entanto, mostra que estas moléculas podem ser benéficas para o tratamento da doença por atuarem em diferentes mecanismos envolvidos na gênese e no reparo da lesão ulcerativa.

1.4 LYSO-7

A molécula indol-tiazolidínica denominada LYSO-7, ([5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona)]) (Figura 5), foi desenhada e sintetizada pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o intuito de atuar como um agonista PPAR e inibidor de COX-1 e COX-2 (SANTIN et al., 2013a).

Figura 5. Estrutura química do composto LYSO-7



Fonte: Adaptado de Santin et al. (2013a).

Recentes evidências têm demonstrado que a inibição simultânea das enzimas da COX e a ativação de receptores PPAR possam ser um alvo relevante no tratamento de doenças inflamatórias e câncer. A expressão PPAR reduzida e a alta expressão de COX-2 são relacionadas com a progressão de cânceres e tumores associados à infiltração de macrófagos (PANCIONE et al., 2009; MEYER et al., 2009).

Estudos realizados em colaboração com o *Diabetes Research Institute* e Universidade de Brasília evidenciaram que o composto LYSO-7 apresenta atividade agonista sobre as três isoformas: PPARα, PPARβ/δ e PPARγ, sendo assim um agonista PPAR pan. Ainda, o composto LYSO-7 apresenta cerca de 50% da potência do celocoxibe sobre a COX-2 e 35% da potência da indometacina na inibição da COX-1. Interessantemente, resultados obtidos em estudos in silico corroboraram os dados experimentais. As pontuações de ancoragem para celecoxibe e indometacina contra os alvos da COX foram maior do que para LYSO-7 e pioglitazona, mas a situação foi revertida no caso de ligação da indometacina em alvos PPAR, onde as pontuações de ancoragem para LYSO-7 e pioglitazona foram maiores. De fato, os resultados de ancoragem para LYSO-7 contra alvos PPAR

foram maiores do que os obtidos contra as enzimas da COX, corroborando a ideia de que a inibição da COX não é o único alvo responsável pela atividade do composto LYSO-7 (SANTIN et al., 2013a).

Estudos realizados *in vitro* mostram que o tratamento de neutrófilos com LYSO-7 ou pioglitazona previamente a estimulação com LPS inibiu a produção de NO e IL-1β. No entanto, o efeito ocasionado pelos tratamentos foi abolido em neutrófilos previamente tratados com GW9962, um conhecido antagonista PPARγ mostrando, assim, que a atividade da LYSO-7 em neutrófilos é dependente da ativação PPARγ (SANTIN et al., 2013a).

Apesar do fato do composto LYSO-7 ser um agonista PPAR pan, com fraco efeito agonista sobre receptores PPARγ, o efeito anti-inflamatório do composto LYSO-7 em neutrófilos é principalmente mediado por este receptor (SANTIN et al., 2013a; SANTIN et al., em anexo) eicosapentaenóico. Dados da literatura sugerem que a suave ativação de receptores PPARγ, ao invés da sua total ativação, possa ser uma ótima estratégia para melhorar a sensibilidade à insulina e evitar efeitos desfavoráveis da ativação PPARγ (COCK et al, 2004; AMATO & NEVES, 2012). Com base neste conceito, tem sido proposto que os agonistas parciais de receptor PPARγ possam ser uma estratégia para manter os benefícios da ativação deste receptor e ao mesmo tempo reduzir os efeitos adversos, dose-dependentes, observados com o uso dos agonistas seletivos. A base molecular dos efeitos destas novas moléculas agonistas parciais ainda não esta bem esclarecida, mas provavelmente resulta de uma ligação distinta ao receptor ou efeitos diferentes sobre o recrutamento de cofatores transcricionais (CHOI et al., 2010; 2011; AMATO et al., 2012). No entanto, não se podem excluir o papel dos receptores PPARα e PPARβ/δ nos efeitos farmacológicos do composto LYSO-7.

Estes dados, em conjunto, sugerem que a LYSO-7 possa ter efeito terapêutico em diferentes doenças de origem inflamatória, tanto na indução do processo como na resolução do mesmo.

2 OBJETIVOS

A literatura tem mostrado a importância da ação de agonistas PPARs na terapêutica de diferentes doenças e, mais recentemente, sobre a úlcera gástrica. Assim, este projeto investigou os mecanismos de ação da LYSO-7, uma molécula indol-tiazolidínica desenhada e sintetizada para ser um agonista PPAR e inibidor de COX, sobre o desenvolvimento e resolução da úlcera gástrica experimental em camundongos e sua toxicidade sobre alguns parâmetros *in vivo.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss, ou Balb/c machos, pesando entre 25 e 35 g provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Adicionalmente foram empregados camundongos Balb/C machos nocautes para o gene de anexina-A1 ($ANXA1^{-/-}$), gerados a partir de matrizes gentilmente cedidas pelo Dr. Mauro Perretti (*William Harvey Research Instititute of London*). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em salas com controle de temperatura (22-25ºC), umidade (40-60%) e ciclos controlados (claro/escuro, 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Doze horas anteriores aos experimentos, quando necessário, os animais foram mantidos em jejum e uma grade foi adicionada para inibir a coprofagia tendo livre acesso a água.

Quanto às questões éticas, o projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade Ciências Farmacêuticas da USP (Protocolos: CEUA/FCF/298 e CEUA/FCF/399).

3.2 Úlcera gástrica induzida por etanol/HCl

O método empregado foi descrito por Mizui & Doteuchi et al. (1983), com algumas modificações. Os camundongos Swiss foram divididos em diferentes grupos que foram pré-tratados por via oral com bezafibrato 25 ou 50 mg/kg (agonista PPAR pan), veículo ou LYSO-7 5, 25 ou 50 mg/kg. Após uma hora, os animais receberam 100 µL/10g de peso do animal de etanol 60%/HCl 0,03 M (Et/HCl) por via oral e, uma hora após a administração do agente lesivo, os mesmos foram sacrificados. Em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da curvatura maior. As imagens dos estômagos foram captadas e analisadas pelo programa de análise EARP para determinar a percentagem de área lesada.

3.3 Histologia

Após o experimento de úlcera aguda induzida por Et/HCl, os estômagos foram fixados em solução de formol, onde ficaram imersos por 24 horas e após este período foram imersos em uma solução de álcool 70%. Posteriormente, os estômagos foram emblocados e cortados (7 µm de espessura) em micrótomo de maneira semi-seriada. As lâminas obtidas segundo esse processo foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina para análises morfológicas em microscopia-óptica.

3.4 Avaliação da atividade PPARγ do composto LYSO-7

Para avaliar a atividade agonista PPARγ camundongos Swiss foram pré-tratados com GW9962 (2 mg/kg, i.p., Sigma Aldrich), um antagonista PPARγ, ou PBS quinze minutos antes do tratamento com LYSO-7 (50 mg/kg), após uma hora do tratamento a solução de Et/HCl foi administrada. Uma hora após a administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados. Em seguida, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da curvatura maior. As imagens obtidas foram digitalizadas e analisadas pelo programa de análise EARP para determinar a percentagem de área lesada.

3.5 Microscopia intravital

A microscopia intravital é uma técnica utilizada para o estudo da dinâmica dos eventos da microcirculação *in vivo*, pela observação direta da rede microvascular de tecidos transiluminados ou não. As imagens da microcirculação do estômago foram obtidas em microscopia ótica (Carl-Zeiss, Axioplan II; objetivas 2,5; 10 ou 40 vezes) e capturadas pela câmera de projeção de imagem (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss), ligada ao microscópio, acoplado a um sistema computacional. O computador possui um programa de análise de imagem (Axio vision 4, Carl-Zeiss) que permite análises quantitativas/qualitativas das imagens digitalizadas.

Camundongos Swiss foram anestesiados e submetidos à manipulação cirúrgica para canulação da veia femural e traqueotomia bem como exposição da

microcirculação do estômago para observação da rede microcirculatória conforme descrito acima. A observação da microcirculação do estômago foi realizada em microscopia de fluorescência, com epi-iluminação. Os leucócitos foram marcados com rodamina 0,02%. Os ensaios foram realizados com animais submetidos à úlcera gástrica, tratados ou não com LYSO-7 (50 mg/kg). O experimento também foi realizado utilizando animais sham. Ainda, com intuito de investigar a participação do NO na gastroproteção do composto LYSO-7, animais foram pré-tratados com L-NAME (70 mg/kg, i.p), uma hora após foi administrado o tratamento (LYSO-7, 50 mg/kg, v.o.) e uma hora depois administrado por via oral o agente lesivo Et/HCl. Para cada animal foram visualizados 5 diferentes campos da microcirculação, sendo avaliada a percentagem de vasos parados.

3.6 Atividade da enzima mieloperoxidase no estômago

O tecido do estômago foi pesado e imerso em tampão fosfato (pH 6,2 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-trimetilamônio e 5 mM EDTA) na concentração de 3 mL/g de tecido estomacal. A seguir, as amostras foram homogeneizadas duas vezes consecutivas, por período de 30 segundos cada. Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 17.500 rpm durante 15 min à temperatura de 4ºC e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de MPO. Assim, 680 µL de PBS contendo 0,25% de albumina bovina sérica, 500 µL de tampão fosfato pH 6.2, 100 µL de água oxigenada (0,0005%), 40 µL da amostra e 100 µL de orto-dianisidina (1,25 mg/mL) foram transferidos para tubos de ensaio de vidro para a reação. Após 15 min, a reação foi paralisada pela adição de 100 µL de azida sódica (1%). A quantificação da absorbância foi realizada por espectrofotometria (450 nm) em leitor de placas.

3.7 Parâmetros citológicos – Sangue e Medula óssea

O sangue circulante foi obtido através da punção da aorta abdominal e as células da medula óssea foram obtidas através da vivissecção nos animais para retirada do fêmur, mantendo as epífises preservadas. Após a extração as epífises foram removidas e o canal medular foi lavado com 2 mL de meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), utilizando-se seringa de 3 mL e agulha de calibre 13

mm. A suspensão celular foi colocada em tubos falcon, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantida em banho de gelo. O número total de células foi quantificado com auxílio da câmara de Neubauer, após diluição de 1:20 com líquido de Türk. A contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, corados com solução corante de May Grumwald-Giemsa. Os esfregaços foram analisados em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes).

A quantidade de granulócitos na medula foi realizada por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACScalibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Os leucócitos obtidos da medula óssea foram incubados com anticorpo monoclonal anti-granulócito Ly6G (FITC; BD Pharmigen, San Jose, CA, USA). O anticorpo foi diluído 1:100 em PBS e a incubação foi realizada por 20 minutos a 4ºC, sob proteção da luz. Imediatamente após a incubação foi realizada a análise e os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, permitindo a leitura computadorizada (Macintosh Apple, San Jose, CA, USA) pelo software FlowJo. Os dados de 10.000 células foram obtidos sendo somente considerados os leucócitos com morfologia viável para análise. Os resultados foram expressos utilizando o número absoluto de células.

3.8 Depleção de neutrófilos circulantes

Para depleção dos neutrófilos circulantes camundongos Swiss foram pré-tratados 48 horas antes do experimento de indução de úlcera gástrica com solução de Et/HCl com 50 µL de anticorpo anti-granulócito (Anti-Ly6G, eBioscience) ou PBS estéril. A mensuração da quantidade total e diferencial de células foi realizada em 24 e 48 horas, utilizando câmara de Neubauer e esfregaço sanguíneo, respectivamente.

3.9 Quantificação da expressão proteica de iNOS, eNOS e PPARγ

A quantificação da expressão proteica de iNOS, eNOS e PPARγ foram realizadas por Western Blot, a proteína dos estômagos foi extraída em tampão Tris (50 mM, pH 7.4) contendo leupeptina (10 µg/mL), inibidor de tripsina (10 µg/ml), aprotinina (2 µg/mL) e PMSF (1 mM). As proteínas do homogenato foram separadas

utilizando gel de poliacriacrilamida (SDS-PAPE; 7% ou 12%) de acordo com Laemmli (1970) e foram transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose. Após o bloqueio de sítios inespecíficos com caseína 1%, as membranas foram incubadas overnight com anticorpo primário contra iNOS (500 ng/mL; BD Transduction Laboratories, USA), eNOS (500ng/mL; BD Transduction Laboratories, USA) ou PPARγ (500 ng/mL; Santa Cruz, USA). As membranas foram lavadas com tampão Tris contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas com anticorpo secundário. Um ensaio de quimioluminescência (HRP SuperSignalWestPico; Pierce, EUA) foi utilizado para detectar as bandas imunorreativas. As intensidades das bandas foram estimadas por análise de densitometria e foram comparadas com a intensidade da expressão de β-actina.

3.10 Expressão gênica de PPARγ

A transcrição de RNAm foi quantificada em amostras de tecido estomacal por PCR-real time (RT-PCR). As amostras foram estocadas a -80ºC em tubos livres de RNA e solução de lise. As amostras foram homogeneizadas por centrifugação e então digeridas com proteinase K (200µg/mL em solução de lise) por 12 horas a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14,000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa contendo RNA foi separada. A extração total de RNA foi realizada com ABI PRISM 6100 ácido nucléico prepstation (Appplied Biosystem, USA). O RNA foi seco utilizando um secador UNIVAPO 100H (UNIEQUIP). Subsequentemente, o RNA foi dissolvido em água livre de RNA (água DEPC) para quantificação da quantidade de RNA (ND-420, Nanodrop technology). A qualidade do ácido nucléico foi avaliada através da medição da relação A260/A280. Dez microlitros de RNA total foram utilizadas para a reação de RT seguindo o protocolo do fabricante (kit High Capacity cDNA Archive, Applied Biosystems, EUA). O cDNA foi então amplificado por PCR em tempo real. A mistura de reação continha TaqMan DNA polimerase (® TaqMan Universal PCR Master Mix 2X) e os iniciadores. O PCR em tempo real foi realizada em equipamento PRISM 7000 Sequence Detection System ABI (Applied Biosystems, EUA).

3.11 Atividade das enzimas antioxidantes no estômago

3.11.1 Determinação da atividade da Glutationa peroxidase (GPx)

O homogenato de tecido estomacal foi diluído em tampão fosfato (1:10). Em 100 µL desta solução foi adicionado 50 µL H_2O_2 (0,25 mM), 20 µL de Glutationa Reduzida (GSH) (10 mM), 20 µL NADPH (4mM), 10 µL de enzima glutationa redutase em PBS, pH 7,8. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm. Os resultados foram expressos em mM/mim por mg de proteína.

3.11.2 Determinação da atividade da Glutationa Redutase (GR)

A atividade dessa enzima foi determinada por espectrofotometria através da oxidação de NADPH a 340 nm. A reação enzimática foi constituída de 100 µL do homogenato previamente diluído em tampão fosfato (1:10), 50 µL de tampão fosfato (1M), pH=7, 10 µL de EDTA (0,2 mM, 20 µL de GSSG (1 mM) e 20 µL de NADPH (0,1 mM). O consumo de NADPH foi determinado pela diminuição da absorbância a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em mM NADPH consumido/min/mg de proteína. O coeficiente de extinção para o NADPH foi 6,22 M^{-1} cm^{-1}.

3.11.3 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo radical supéroxido gerado através do sistema hipoxantina/ xantina oxidase a 37ºC. O homogenato de tecido foi diluído em tampão fosfato (1: 10). Em 100 µL desta solução, foram adicionados 40 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH: 7.4), xantina 0.07U/mL, 20 µL de hipoxantina (100 µM) e 20 µL de NBT. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.11.4 Determinação da atividade da Catalase (CAT)

A mucosa gástrica foi homogeneizada em tampão fosfato pH 6,5. Em uma cubeta de quartzo, 10 µL da amostra diluída foi adicionado a 990 µL de solução

reação 20 mM (Tampão Tris/ EDTA 5mM, pH 8,0 + peróxido de hidrogênio 30% + água miliQ), foram feitas 2 réplicas de cada amostra. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 240 nm.

3.12 Úlcera aguda induzida por indometacina

Foi empregada a metodologia descrita por Rainsford & Whitehouse, (2000), com algumas modificações. Camundongos Swiss foram divididos em diferentes grupos (n=6) que foram pré-tratados por via oral com pioglitazona (40 mg/kg), LYSO-7 (50 mg/kg) ou veículo. Após uma hora, os animais receberam 100 mg/kg de indometacina (v.o). Após quatro horas da administração de indometacina os animais foram sacrificados e os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior, esticados e fotografados, as imagens foram captadas e analisadas pelo software de análise de imagens EARP, a fim de determinar-se a porcentagem de área lesada. A partir do estômago dos animais submetidos ao ensaio de úlcera aguda induzida por indometacina foi preparado um homogenato para a quantificação da concentração de PGE2 (ELISA), IL-6, IL-10 e TNFα (CBA).

3.13 Parâmetros de secreção gástrica

Este experimento foi realizado conforme o método descrito por Shay et al. (1945), com algumas modificações. Camundongos Swiss foram divididos em diferentes grupos (n=6). Em seguida foram anestesiados e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifóide, para amarração do piloro e a administração por via intraduodenal dos diferentes tratamentos: veículo, omeprazol (30 mg/kg) ou LYSO-7 (50 mg/kg). Após os tratamentos, as incisões foram suturadas e quatro horas após a cirurgia os animais foram anestesiados e sacrificados. As incisões foram reabertas e após pinçamento da válvula cárdia (para evitar-se a perda do conteúdo gástrico) o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado e foram analisados os parâmetros: pH e concentração de íons hidrogênio. Após a determinação do pH, foi adicionado 5 mL de água destilada à amostra e esta foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,01 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em pH e mEq/L/4h (Concentração de íons hidrogênio).

3.14 Úlcera crônica induzida por ácido acético

Foi utilizada a metodologia descrita por Takagi (1969), com algumas modificações. Camundongos Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ foram divididos em diferentes grupos (n=5). Em seguida foram anestesiados e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifóide. Após a exposição do estômago, foi injetado na camada subserosa da parede externa do órgão 20 µL de solução de ácido acético 20%, na face posterior. O local foi pressionado por 30 segundos para evitar o extravasamento do liquido injetado. Cuidadosamente o estômago foi lavado com solução salina 0,9% e então foi feita a sutura da parede abdominal. No dia seguinte após a cirurgia, foi dado início ao tratamento que teve duração de sete dias. Os animais receberam por via oral veículo, 50 mg/kg de LYSO-7 ou bezafibrato 50 mg/kg. Após 7 dias de tratamento os animais foram sacrificados, e os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura. As imagens foram captadas e analisadas pelo software de análise de imagens EARP, a fim de determinar se ocorreu regressão da lesão nos tratamentos quando comparados com o grupo veículo. Foi realizada a determinação da percentagem de área lesada.

3.15 Viabilidade

Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de animais Balb/C WT e ANXA$^{-/-}$ através da administração de glicogênio de ostra (0,1%, i.p., Sigma Aldrich). Neutrófilos ($1x10^6$) foram incubados (a 37ºC com 5% CO_2) na presença ou ausência de LYSO-7 (1, 5 ou 10 µM) por 24 horas. A viabilidade dos neutrófilos foi determinada por ensaio de citometria de fluxo, usando marcação com a proteína Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI), para mensuração de apoptose e necrose celular, respectivamente. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos específicos para o ensaio de citometria de fluxo e incubadas com a proteína Anexina V (conjugada com o fluorocromo FITC) diluída em tampão para anexina (1:100) e com 10 µL de PI na concentração de 50 µg/mL. Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, solução tampão de ligação de anexina foi adicionada aos tubos e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo. Imediatamente após a análise e os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, permitindo a leitura computadorizada (Macintosh Apple, San Jose, CA, USA) pelo

software FlowJo. Os dados de 10.000 células foram obtidos sendo somente considerados os leucócitos com morfologia viável para análise.

3.16 Ensaio de Fagocitose e liberação de mediadores

Os macrófagos foram obtidos através da injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio 4% em camundongos Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$. Quatro dias após a injeção de tioglicolato os animais foram anestesiados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS estéril, as células, após a centrifugação foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR). A suspensão celular (1x10^{7} células/poço) foi incubada em placa de 24 poços, sobre lamínula de vidro redonda, 2 horas, 37ºC com 5% CO_2 para a aderência dos macrófagos. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com PBS estéril para a retirada das células não aderidas e foram adicionados os tratamentos (LYSO-7 1, 5 ou 10 μM), após uma hora foram adicionados os neutrófilos senescentes (1x10^{6} neutrófilos/poço). Os neutrófilos senescentes foram obtidos previamente da cavidade peritoneal de animais Balb/C WT através da administração de glicogênio de ostra (0,1%, i.p., Sigma Aldrich) e incubados em placa de 24 poços, com meio RPMI (1x10^{6} neutrófilos/mL), por 18 h a 37ºC com 5% CO_2 para atingirem o estado de senescência. As lamínulas foram lavadas 1 vez com PBS para retirada do excesso de neutrófilos senescentes e coradas com solução corante de May Grumwald-Giemsa (Sigma Aldrich), modificada (ROSENFELD, 1947). Posteriormente, as lamínulas secas foram coladas inversamente em lâminas de vidro com Bálsamo do Canadá (Synth, Diadema, SP, BR). A leitura das lâminas montadas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). Foram observados 500 macrófagos e o resultado da fagocitose de neutrófilos senescentes foi expresso em porcentagem. No sobrenadante do ensaio de fagocitose foram dosados os níveis de TNFα, IL-10, TGF-1β e VEGF de acordo as instruções do fabricante.

3.17 Expressão de CD36 em macrófagos

A expressão de CD36 em macrófagos foi realizada por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACScalibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Os macrófagos foram obtidos através da injeção intraperitoneal de tioglicolato de

sódio 4% em camundongos Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$. Quatro dias após a injeção de tioglicolato os animais foram anestesiados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS estéril, as células, após a centrifugação foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR). A suspensão celular (1x10^7 células/poço) foi incubada na presença ou ausência de LYSO-7 durante 2 horas a 37ºC com 5 % CO_2. Os macrófagos foram incubados com anticorpo monoclonal anti-CD36 (FITC; BD Pharmigen, San Jose, CA, USA) e anti-F4/80 (PE-Cy5; BD Pharmigen, San Jose, CA, USA). O anticorpo foi diluído 1:100 em PBS e a incubação foi realizada por 20 minutos a 4ºC, sob proteção da luz. Imediatamente após a incubação foi realizada a análise e os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, permitindo a leitura computadorizada (Macintosh Apple, San Jose, CA, USA) pelo software FlowJo. Os dados de 10.000 células foram obtidos sendo somente considerados os leucócitos com morfologia viável para análise. Os resultados foram expressos utilizando o número absoluto de células.

3.18 Expressão proteica de ANXA1 e PPARγ em macrófagos

Os macrófagos foram obtidos através da injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio 4% em camundongos Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$. Quatro dias após a injeção de tioglicolato os animais foram anestesiados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS estéril, as células, após a centrifugação foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR). A suspensão celular (1x10^7 células/poço) foi incubada na presença ou ausência de LYSO-7 durante 2 horas a 37ºC com 5 %CO_2. Após este período as células foram coletadas. A quantificação da expressão proteica de ANXA1 e PPARγ foram realizadas por Western Blot, a proteína dos macrófagos tratados ou não com LYSO-7 foi extraída em tampão Tris (50 mM, pH 7.4) contendo leupeptina (10 µg/mL), inibidor de tripsina (10 µg/ml), aprotinina (2 µg/mL) e PMSF (1 mM). As proteínas do homogenato foram separadas utilizando gel de poliacriacrilamida (SDS-PAPE; 15%) de acordo com Laemmli (1970) e foram transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose. Após o bloqueio de sítios inespecíficos com caseína 1%, as membranas foram incubadas overnight com anticorpo primário contra ANXA1 (500 ng/mL; BD Transduction Laboratories, USA) ou PPARγ (1 µg/mL, Abcam, San Francisco, CA, USA,). As membranas foram

lavadas com tampão Tris contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas com anticorpo secundário. Um ensaio de quimioluminescência (HRP SuperSignalWestPico; Pierce, EUA) foi utilizado para detectar as bandas imunorreativas. As intensidades das bandas foram estimadas por análise de densitometria e foram comparadas com a intensidade da expressão de β-actina.

3.19 Ensaios toxicológicos

3.19.1 Ensaio toxicológico agudo: dose-fixa

Após 12 horas de jejum os camundongos foram tratados com veículo, pioglitazona (2000 mg/kg) ou LYSO-7 (2000 mg/kg). Após a administração, durante as primeiras 12 horas, nos períodos de 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas os sinais tóxicos de caráter geral foram observados, sendo avaliados os seguintes parâmetros: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto da cauda, contorção, trem posterior, tônus corporal, força de agarrar, ataxia, tremores convulsões, estimulações, cauda em straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptoses, micção, defecação, piloereção, respiração, cianose. A partir da 4ª hora até 14 dias após a administração da dose, foi observado no 7º e 14º dia a variação de peso. Ao fim do período de observação, foi contabilizado o número de mortes e todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados, sendo observadas as características macroscópicas dos pulmões, rins, intestinos, fígado, útero, baço e coração (OECD 420, 2001).

3.19.2 Ensaio toxicológico crônico: Doses repetidas

Animais foram tratados diariamente durante 28 dias com veículo, LYSO-7 (50 mg/kg) ou pioglitazona (50 mg/kg). A cada dois dias foram verificados o consumo de ração e a variação de peso dos animais. Semanalmente foi mensurada a glicemia dos animais utilizando aparelho de glicemia capilar. Após 28 dias, os animais foram anestesiados para retirada de sangue e coleta do lavado medular para verificação dos parâmetros citológicos. No sangue foram avaliados parâmetros hematológicos

(hemograma completo), parâmetros bioquímicos (Triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e glicemia) e enzimáticos (ALT e gama-GT). Os órgãos, fígado, baço, pulmão, coração, rim, pâncreas, estômago e intestino delgado foram retirados para análise histológica (OECD 407, 1995).

3.19.3 Ensaio Micronúcleo

Após 12 horas de jejum os camundongos foram tratados por gavagem com veículo, pioglitazona (2000 mg/kg), LYSO-7 (2000 mg/kg) ou MMS (50 mg/kg, i.p., grupo controle positivo). 24 h após os tratamentos os animais foram anestesiados para retirar os fêmures. As células foram obtidas do canal medular que foi lavado três vezes com 1 mL de soro fetal bovino gelado. O material coletado foi submetido à centrifugação a 1000g durante 10 minutos para formação do precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de soro fetal bovino. A viabilidade celular foi verificada utilizando a técnica de exclusão por azul de tripan 4%. Desta suspensão foram realizados os esfregaços das células. As lâminas foram fixadas e coradas pelo método de Rosenfeld.

Foram avaliados 1000 eventos por lâmina aonde foram observados o número de eritrócitos monocromáticos (EM) e policromáticos (EPC), a proporção entre estes e a avaliação de eritrócitos contendo micronúcleo (EPCMN) (MAVOURNIN, et. al., 1990; OECD, 1997; KRISHNA & HAYASHI, 2000).

3.20 Análise Estatística

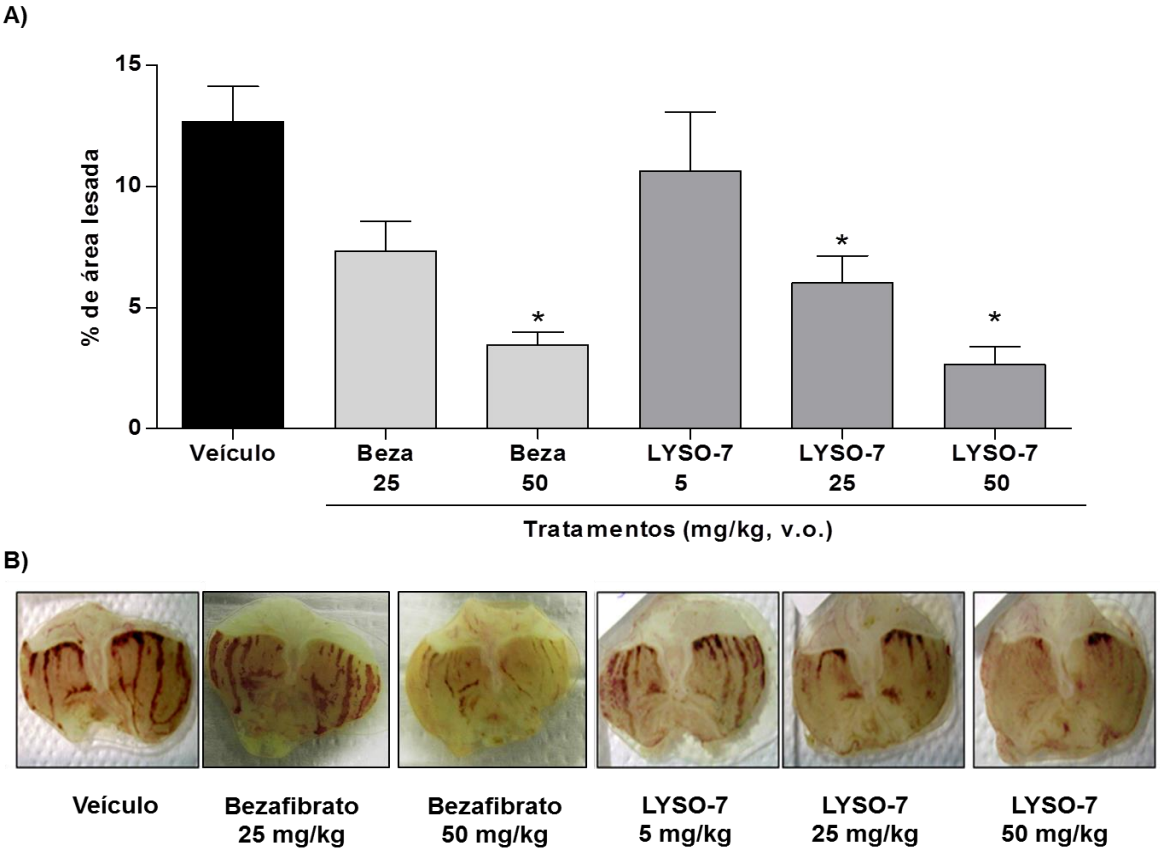
Os resultados obtidos nos experimentos serão expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente por Teste “t” de student ou pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, quando necessário, foram utilizados como pós-teste o Teste de Tukey-Kramer ou Dunett. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism, admitindo como significativamente estatístico o $p<0,05$. Bem como, foram correlacionado os resultados obtidos neste estudo com os dados de estudos prévios reportados pela literatura.

4 RESULTADOS

4.1 LYSO-7 protege o tecido gástrico dos danos provocados pela administração de Et/HCl

A administração oral de Et/HCl é um modelo experimental para induzir úlcera gástrica amplamente utilizado na literatura (MIZUI & DOTEUCHI, 1983; SUN et al., 1991; LI et al., 2008). Utilizando esta metodologia foi possível observar lesões no tecido gástrico 1 hora após a administração da solução de Et/HCl. O pré-tratamento com LYSO-7 diminuiu, de maneira dose-dependente, a lesão do tecido gástrico (Figura 6A e B).

Figura 6. Efeitos do tratamento oral com veículo, bezafibrato ou LYSO-7 no modelo de úlcera gástrica aguda induzida por Et/HCl**.**

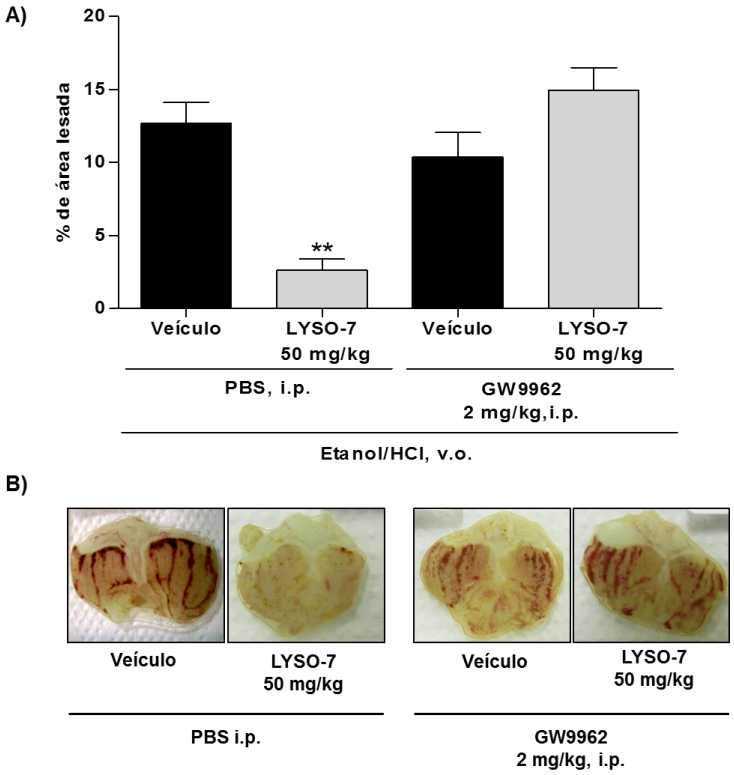


Camundongos Swiss foram tratados 1 hora antes da administração da solução de Et/HCl. O tecido gástrico foi removido cirurgicamente uma hora após a administração de Et/HCl. A) percentagem de área lesionada; B) imagens representativas do tecido gástrico. Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. *p <0,05 vs veículo.

4.2 O tratamento *in vivo* com LYSO-7 aumenta a expressão gênica e proteica de PPARγ no tecido gástrico.

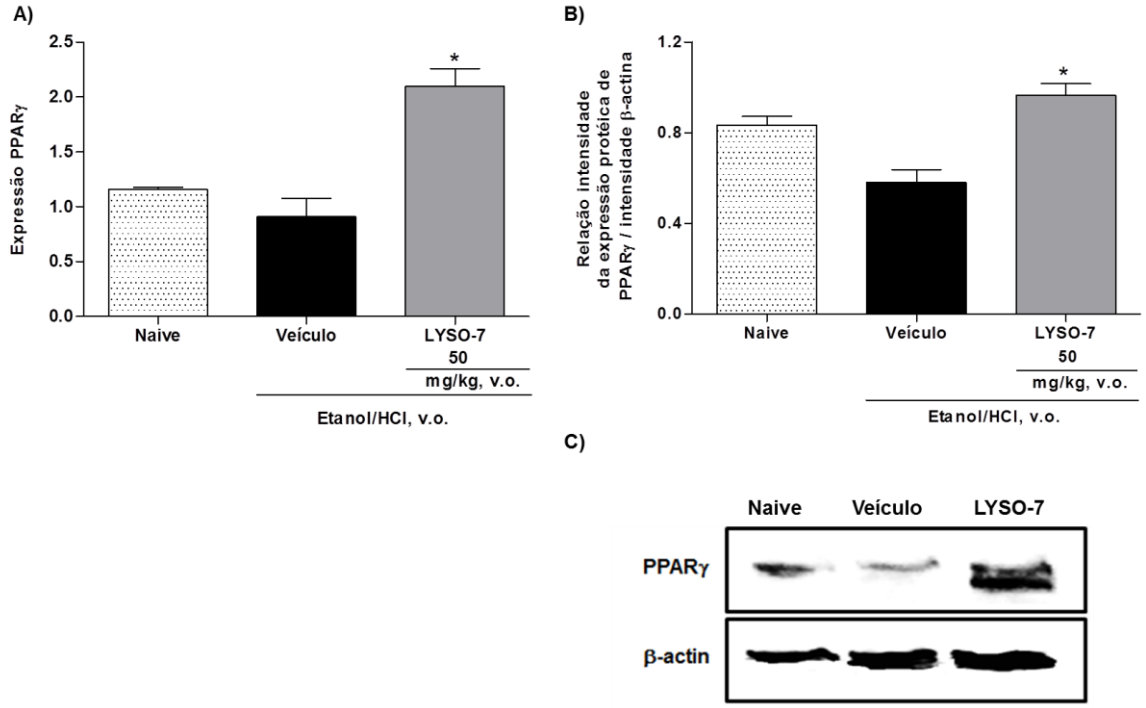
O composto LYSO-7 é uma molécula indol-tiazolidínica concebida para ser um inibidor de COX e agonista PPAR pan (SANTIN et al., 2013a). Os resultados obtidos mostram que o efeito protetor no modelo de úlcera gástrica induzida por Et/HCl é dependente da sua atividade sobre o receptor PPARγ, pois o efeito protetor sobre o tecido gástrico foi bloqueado em camundongos pré-tratados com GW9962, um reconhecido antagonista PPARγ (Figura 7A e B). Adicionalmente, o tratamento *in vivo* com LYSO-7 provocou aumento na expressão proteica e gênica de PPARγ no tecido gástrico de animais submetidos ao ensaio de úlcera aguda induzida por Et/HCl (Figura 8A, B e C).

Figura 7. Participação do receptor PPARγ no efeito protetor do composto LYSO-7 no modelo de úlcera aguda induzida por Et/HCl em camundongos



Camundongos Swiss machos foram pré-tratados com GW9962 ou PBS (i.p.) e tratados com veículo ou LYSO-7 (p.o.) quinze minutos mais tarde. A solução de Et/HCl foi administrada 1 hora após os tratamentos. O tecido gástrico foi coletado 1 hora após a administração de Et/HCl. A) percentagem de área lesionada; B) imagens representativas do tecido gástrico. Resultados expressos como media ± e.p.m. de 5 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. **p <0,01 vs respectivo veículo.

Figura 8. Efeitos do tratamento com LYSO-7 sobre a expressão proteica e gênica de PPARγ no tecido gástrico.



Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo ou LYSO-7, v.o., 1 hora antes da administração oral da solução de Et/HCl. O tecido foi coletado 1 hora após a administração de solução de Et/HCl. A) expressão gênica de PPARγ no tecido gástrico; B) expressão proteica de PPARγ no tecido gástrico; C) imagem representativa do gel de eletroforese. Resultados expressos como media ± e.p.m de 4 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. *p<0,01 vs veículo.

4.3 LYSO-7 não interfere nos parâmetros de secreção gástrica

Os dados apresentados na tabela 1 mostram que o pH e a concentração de íons H^+ no estômago de animais submetidos a ligadura de piloro foram de 3,26 e 135,0, respectivamente. Estes valores foram modificados pelo tratamento com omeprazol, o qual ocasionou um aumento no pH e uma redução na concentração de íons H^+. No entanto, o tratamento com LYSO-7 não alterou nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 1. Efeitos do tratamento com omeprazol e LYSO-7 sobre os parâmetros de secreção gástrica obtidos em animais com ligadura de piloro.

Tratamento	Dose (mg/kg)	pH	[H+] mequiv./mL/4h
Veículo	-	3,26 ± 0,12	135,0 ± 10,41
Omeprazol	30	4,24 ± 0,19*	62,5 ± 5,18*
LYSO-7	50	3,32 ± 0,17	117,5 ± 18,33

Resultados expressos como media ± e.p.m. de 5 animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett's. *p<0,05 vs veículo.

4.4 LYSO-7 inibe a migração de neutrófilos para o tecido gástrico

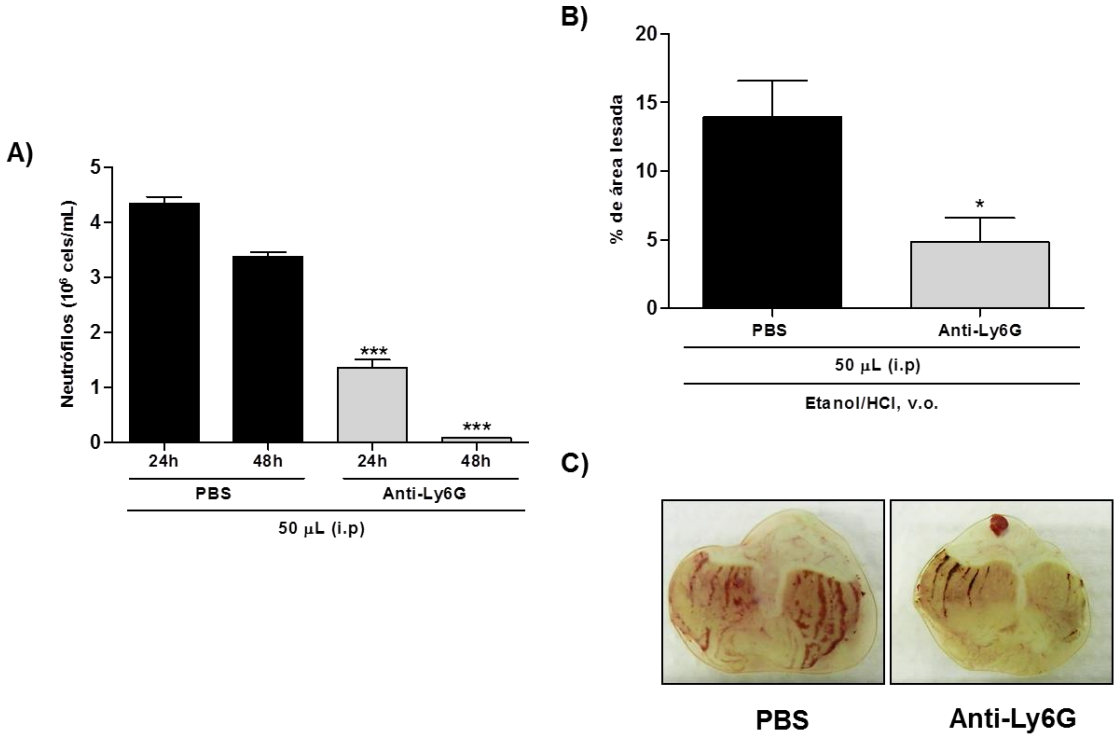
Embora a participação de neutrófilos nos danos induzidos pela administração de Et/HCl já tenha sido proposto por diversos autores, o seu real papel sobre o processo não foi previamente mostrado. Assim, com o intuito de avaliar a participação dos neutrófilos na lesão gástrica induzida por Et/HCl animais foram pré-tratados com 50 µL de anticorpo anti-granulócito (anti-Ly6G) ou PBS estéril pela via intraperitoneal. Após 24 e 48 horas, o sangue periférico foi coletado pela veia submandibular para quantificar a percentagem de neutrófilos circulantes. Os dados obtidos mostram que animais tratados com anticorpo monoclonal anti-granulócito apresentam redução de 95% na quantidade de neutrófilos circulantes após 48 horas (Figura 9A), bem como redução na extensão da lesão gástrica provocada pela administração da solução de Et/HCl (Figura 9B e C) quando comparado a animais pré-tratados com PBS. As imagens histológicas e a atividade da enzima MPO no tecido gástrico reforça que os neutrófilos rapidamente se acumulam no tecido gástrico após a administração de Et/HCl, efeitos estes que foram reduzidos pelo pré-tratamento com LYSO-7 (Figuras 10A, B e C).

A análise histológica revelou ainda que o tecido gástrico de animais pré-tratados com LYSO-7 apresenta leve descamação das células que recobrem o estômago e uma baixa infiltração de leucócitos. No entanto, animais pré-tratados

com veículo apresentaram hemorragia, fortes danos glandulares e celulares é infiltração de leucócitos (Figura 10C).

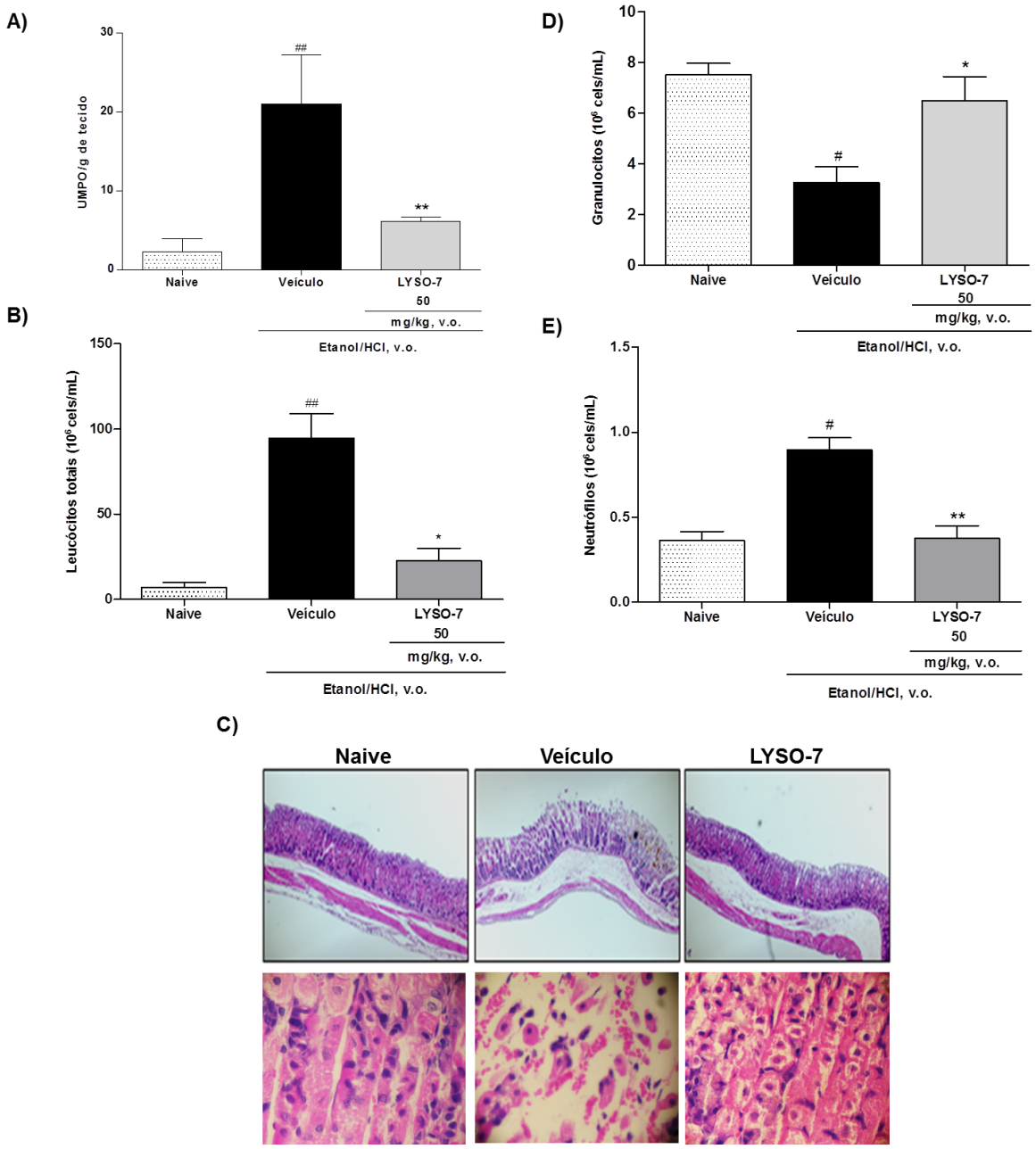
O composto LYSO-7 também inibiu a mobilização de neutrófilos da medula óssea para o sangue periférico, pois a redução e aumento do número de neutrófilos na medula óssea e no sangue, respectivamente, observados em animais tratados somente com o veículo foram revertidos em animais tratados com LYSO-7. Os valores obtidos em animais tratados com a LYSO-7 foram equivalentes aos observados em animais naive, que não receberam nenhum tratamento (Figura 10D e E).

Figura 9. Participação dos neutrófilos no dano gástrico provocado pela solução de Et/HCl.



Camundongos Swiss machos foram pré-tratados com PBS ou anticorpo anti-granulócito (i.p.), o sangue foi coletado em 24 e 48 horas após. A solução de Et/HCl foi administrada, v.o. 48 horas mais tarde. O tecido gástrico foi coletado após 1 hora da administração de Et/HCl. A) Número de neutrófilos no sangue; B) percentagem de lesão gástrica; C) imagens representativas do tecido gástrico. Resultados expressos como media ± e.p.m de 4 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. *p<0,05 e ***p <0,001 vs PBS.

Figura 10. Efeitos da LYSO-7 sobre o tráfego de neutrófilos na vigência de úlcera aguda induzida por Et/HCl em camundongos.



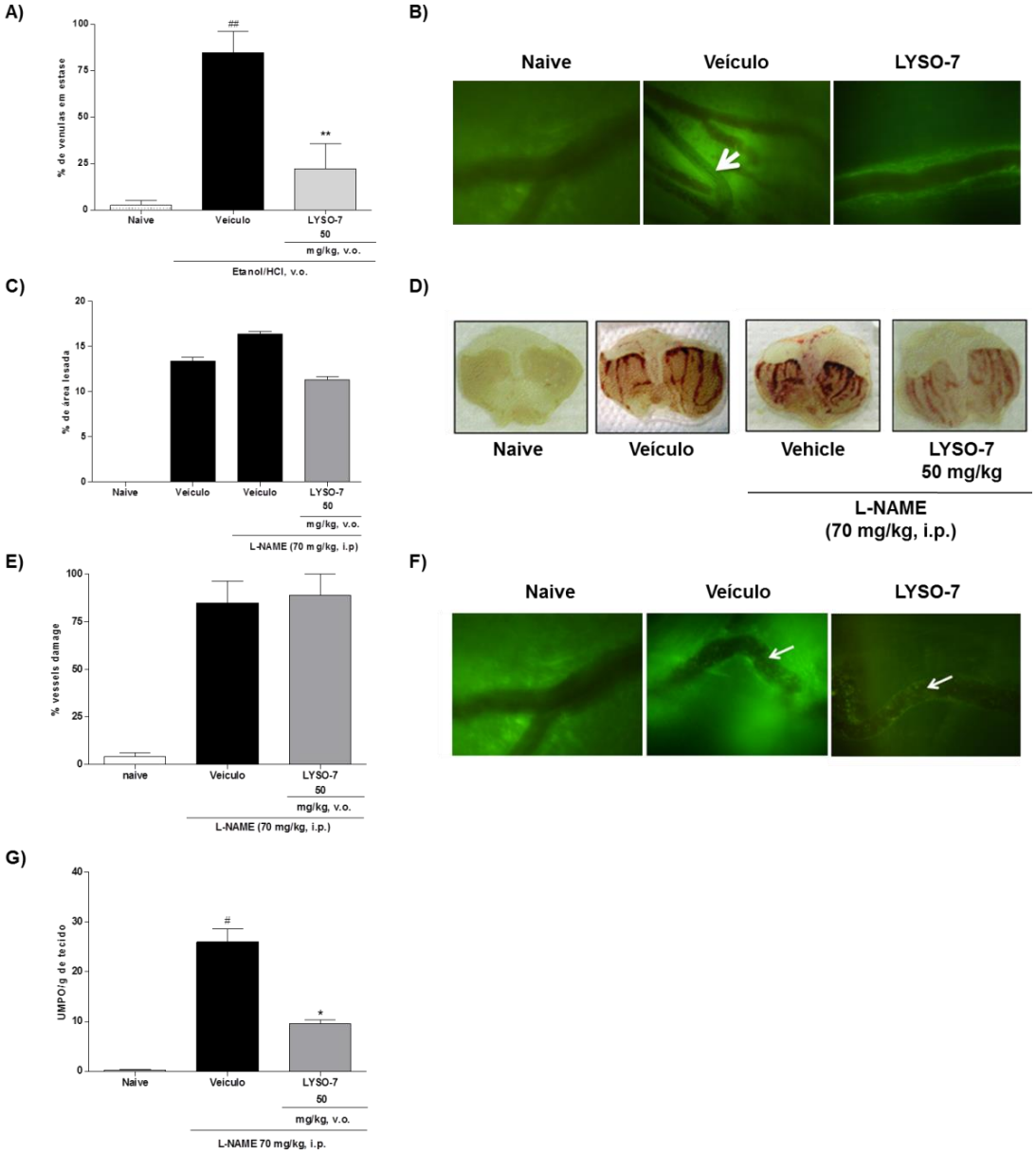
Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo ou LYSO-7 1 hora antes da administração oral da solução de Et/HCl e o tecido gástrico, sangue e o perfusato da medula óssea foram coletados 1 hora mais tarde. A) atividade da enzima MPO no tecido gástrico; B) número de leucócitos no tecido gástrico; C) imagem representativa da infiltração de leucócitos e danos no tecido gástrico (aumento de 100x e 400x); D) número de granulócitos na medula óssea; E) número de neutrófilos na circulação. Resultados expressos como media ± e.p.m. de 5 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. *p <0,05; **p <0,01 vs veículo; $^{\#}$p<0,05; $^{\#\#}$p<0,01 vs naive.

4.5 LYSO-7 reverte a estase do fluxo sanguíneo no tecido gástrico induzido por Et/HCl. Efeito mediado pelo NO

A análise da rede microcirculatória utilizando a técnica de microscopia intravital em animais anestesiados foi realizada para verificar possíveis alterações microcirculatórias no estômago. Cabe ressaltar que o estudo de microscopia intravital realizado neste trabalho difere de outras metodologias já relatadas na literatura (OHNO et al., 1995), uma vez que o protocolo realizado não requer manipulação cirúrgica (realização de incisões) no estômago, somente a exteriorização do órgão. Os resultados obtidos mostram que a administração de Et/HCl causa rápida estase na rede microcirculatória e que o pré-tratamento com LYSO-7 inibiu este efeito (Figura 11A e B).

O NO tem sido proposto com um importante mediador endógeno de proteção contra lesões gástricas induzidas por diferentes agentes. Os resultados obtidos mostram que o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor não especifico da síntese de NO, ocasiona aumento nas lesões provocadas pelo Et/HCl e, inibe, parcialmente, os efeitos protetores da LYSO-7 (Figura 11C e D). Ainda, o pré-tratamento com L-NAME, bloqueou a ação da LYSO-7 sobre o fluxo sanguíneo na microcirculação gástrica (Figura 11E e F), mas não alterou o bloqueio sobre o influxo de neutrófilos no tecido gástrico causado pela LYSO-7 (Figura 11G).

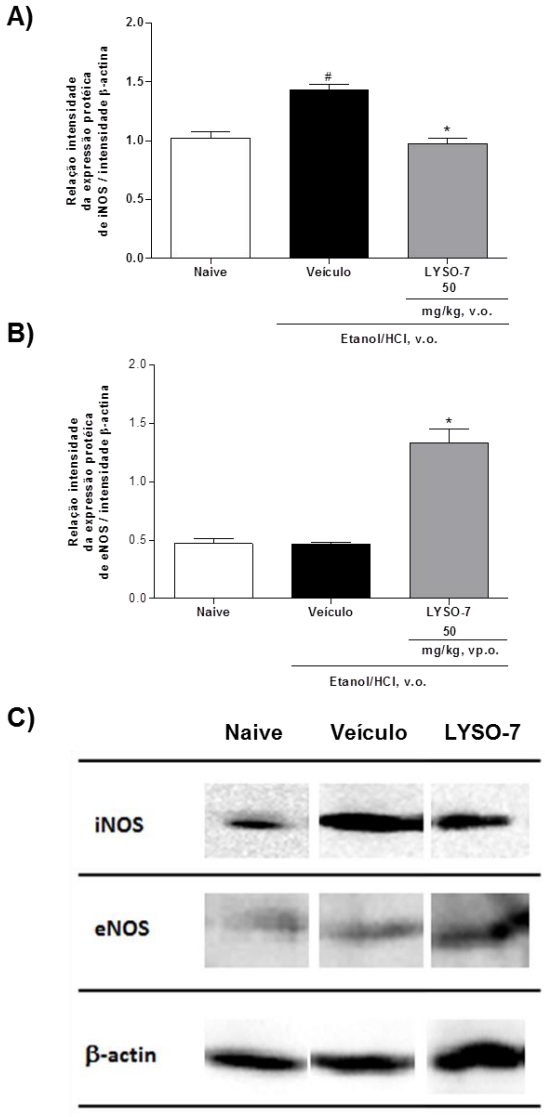
Figura 11. Efeitos da LYSO-7 sobre o fluxo sanguíneo da microcirculação no tecido gástrico após administração de Et/HCl.



Camundongos Swiss machos foram pré-tratados com L-NAME (i.p.) e 15 minutos mais tarde foram tratados com veículo ou LYSO-7, v.o.. Solução de Et/HCl foi administrada 1 horas mais tarde. O tecido gástrico foi cirurgicamente exposto para observação in situ por microscopia intravital 1 hora depois dos tratamentos. A) percentagem de vênulas em processo de estase; B) imagem representativa das vênulas na microcirculação gástrica; C) percentagem de área lesada; D) imagens representativas do tecido gástrico; E) percentagem de vênulas em processo de estase; F) imagem representativa das vênulas na microcirculação gástrica; G) atividade da MPO no tecido gástrico. As setas brancas indicam as vênulas em processo de estase. Resultados expressos como media ± e.p.m. de 5 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. **p<0,01 vs. veículo; *p<0,05 vs. veículo + L-NAME e $^{##}$p<0.01 vs. naive.

Com base na clara evidência da participação do NO sobre os efeitos protetores da LYSO-7 no modelo de úlcera induzida por Et/HCl, as ações do composto LYSO-7 sobre a expressão proteica das enzimas da NOS foram investigadas no tecido gástrico. Os dados apresentados na Figura 12 mostram que o tratamento com LYSO-7 foi capaz de diminuir a expressão de iNOS e aumentar a expressão de eNOS no tecido gástrico (Figura 12A, B e C).

Figura 12. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a expressão da NOS em animais submetidos ao ensaio de úlcera aguda induzida por Et/HCl.

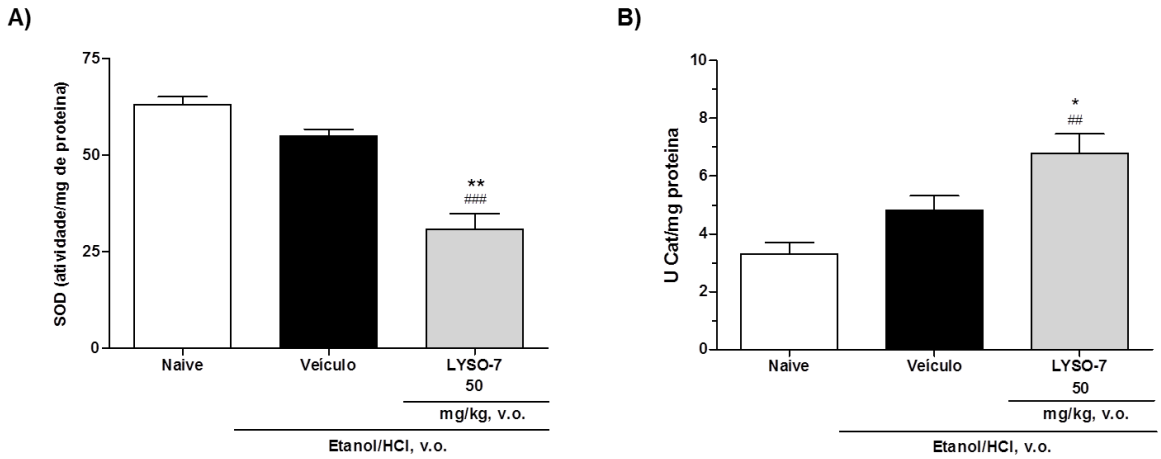


Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo ou LYSO-7, v.o., 1 hora antes da administração oral da solução de Et/HCl. O tecido gástrico foi coletado 1 hora após a administração da solução de Et/HCl. A) imagem representativa do gel de eletroforese; B) expressão proteica de iNOS; C) expressão proteica de eNOS. Resultados expressos como media ± e.p.m. de 4 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. *$p<0,05$ vs veículo; $^{\#}p<0,05$ vs naive.

4.6 LYSO-7 modifica o perfil das enzimas do sistema antioxidante

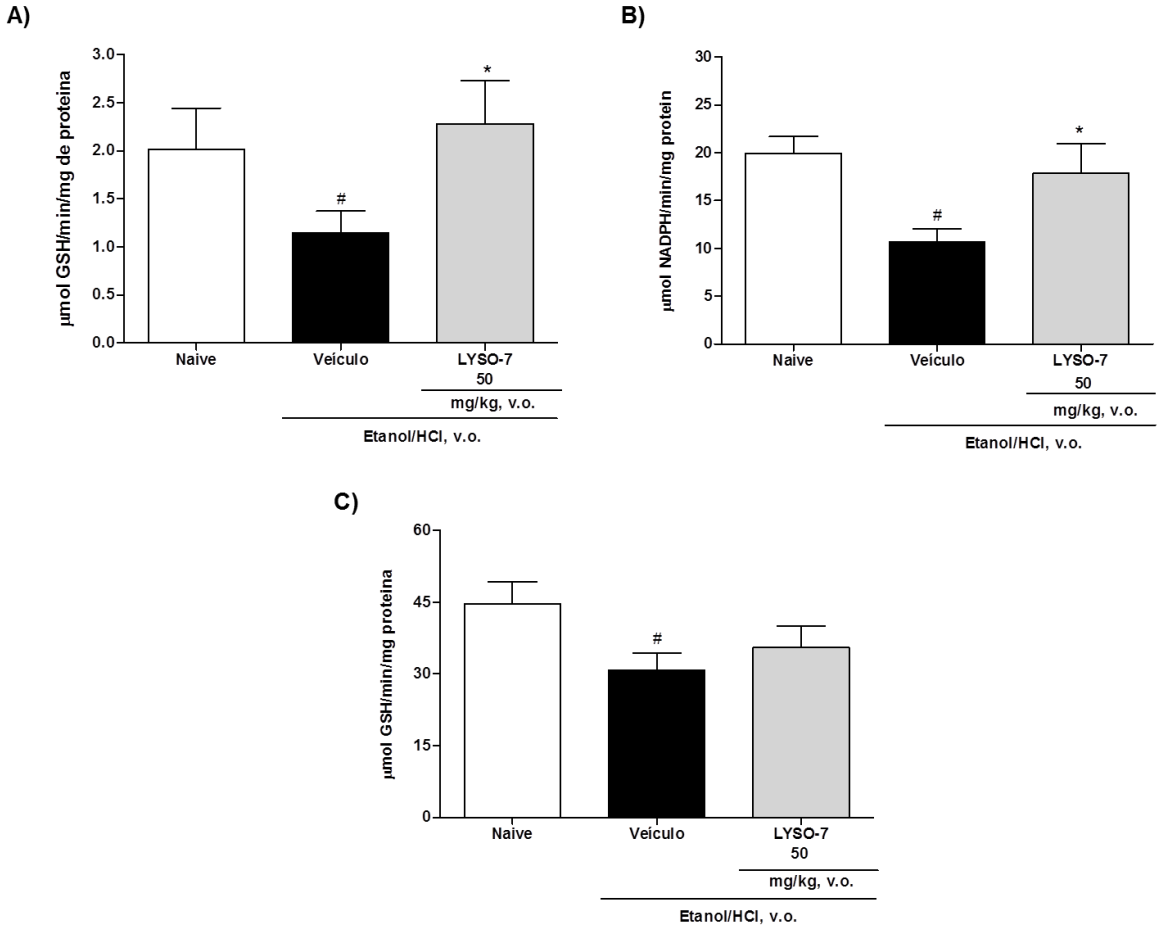
O perfil das enzimas do metabolismo antioxidante foi realizado no tecido gástrico. A indução da úlcera gástrica com Et/HCl provocou elevação na atividade enzimática da catalase e reduziu a atividade da SOD, GPx, GR e GST. O pré-tratamento com LYSO-7 aumentou a atividade da catalase e SOD, e restaurou os níveis das enzimas GPx, GST e GR a parâmetros semelhantes aos encontrados em tecidos coletados de animais naive (Figura 13 e 14).

Figura 13. Efeito do composto LYSO-7 sobre atividade enzimática no estômago de animais submetidos ao ensaio de úlcera aguda induzida por Et/HCl.



Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo ou LYSO-7, v.o., 1 hora antes da administração oral da solução de Et/HCl. O tecido gástrico foi coletado 1 hora após a administração da solução de Et/HCl. A) Superóxido dismutase (SOD) e B) Catalase (Cat). Resultados expressos como média ± e.p.m de 5 animais. Comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. *p<0,05 e **p<0,01 vs veículo; $^{\#\#}$p<0,01 e $^{\#\#\#}$p<0,001 vs naive.

Figura 14. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a atividade enzimática no estômago de animais submetidos à úlcera aguda induzida por Et/HCl.



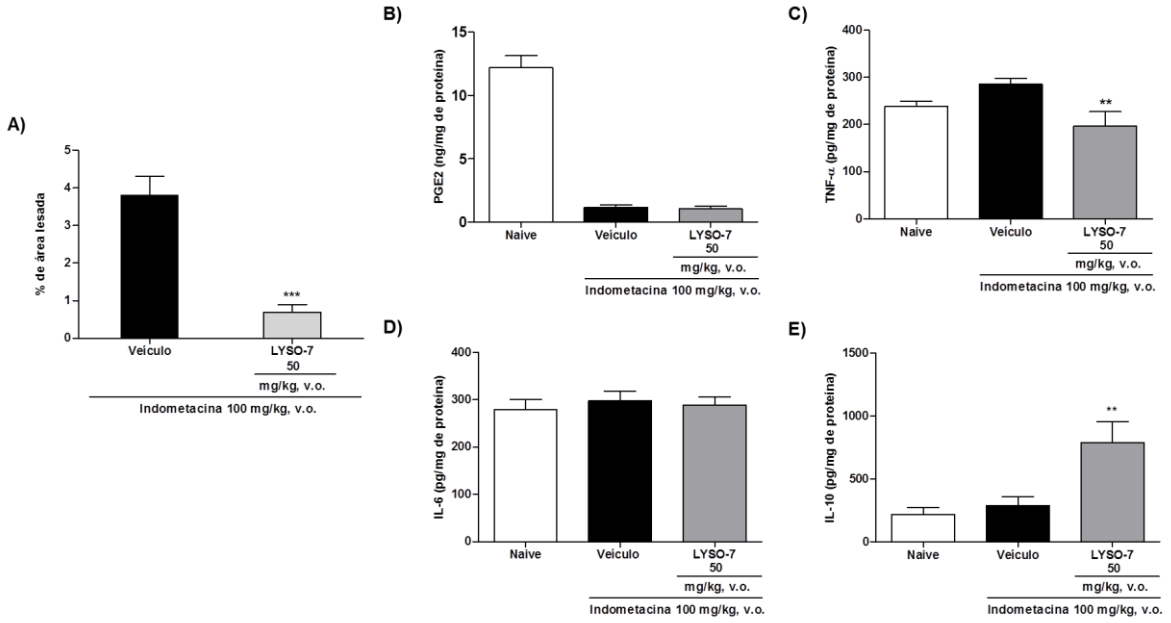
Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo ou LYSO-7, v.o., 1 hora antes da administração oral da solução de Et/HCl. O tecido gástrico foi coletado 1 hora após a administração da solução de Et/HCl. A) Glutationa peroxidase (GPx); B) Glutationa redutase (GR); C) Glutationa transferase (GST). Resultados expressos como média ± e.p.m. de 5 animais. Comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. *$p<0,05$ vs veículo e $^{\#}p<0,05$, $^{\#\#}p<0,01$ vs naive.

4.7 LYSO-7 inibe a lesão induzida pela administração aguda de indometacina

O tratamento com LYSO-7 reduziu significativamente a área lesada provocada pela administração de indometacina em comparação a área lesada de animais tratados com veículo (Figura 15A). A análise do mediador inflamatório PGE2 no homogenato de estômago dos animais submetidos ao ensaio mostrou que a administração de indometacina ocasiona diminuição na concentração de PGE2. O tratamento com LYSO-7 não foi capaz de prevenir a diminuição na concentração de

PGE2 (Figura 15B). Entretanto, o pré-tratamento com LYSO-7 foi capaz de diminuir a concentração de TNFα e aumentar os níveis de IL-10 no tecido gástrico (Figura 15C e E). Os níveis de IL-6 não foram alterados (Figura 15D).

Figura 15. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a úlcera aguda induzida por indometacina.



Camundongos Swiss machos foram tratados com veículo ou LYSO-7, v.o., 1 hora antes da administração de indometacina. O tecido gástrico foi coletado 1 hora após a administração de indometacina. A) Percentagem de área lesada; B) concentração de PGE2; C) Concentração de TNFα; D) Concentração de IL-6; E) Concentração de IL-10. Dados expressos como média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Dunnett's. *p<0,001 ou **p<0,01 vs veículo.

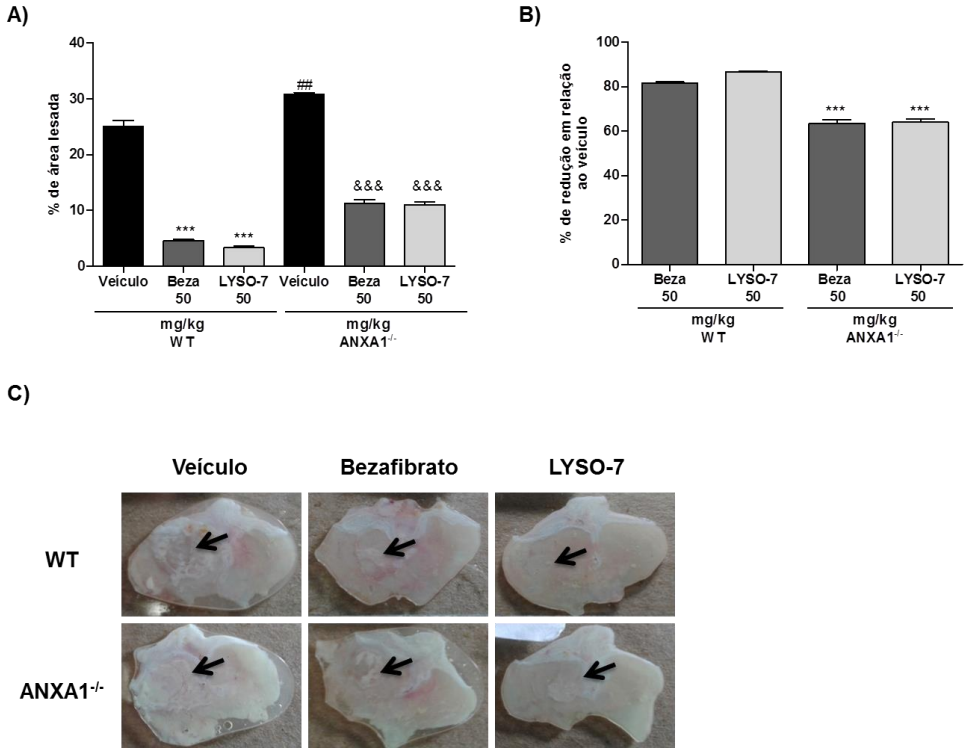
4.8 LYSO-7 diminui a área lesada no modelo de úlcera crônica

O modelo de úlcera crônica, induzida por ácido acético a partir de uma injeção na camada subserosa do estômago, foi caracterizado a partir da análise macroscópica do estômago de animais submetidos ao ensaio (Figura 16C). Vale ressaltar que estes ensaios foram conduzidos em camundongos da linhagem Balb/C, uma vez que se tinha o objetivo de investigar o papel da ANXA1 nos efeitos induzidos pela LYSO-7. Os animais nocautes para ANXA1 são da linhagem Balb/C e assim, neste estudo, os animais controles passaram a ser denominados de WT e os

nocautes de ANXA1$^{-/-}$. A injeção de 20 µL de uma solução de ácido acético a 20% foi suficiente para evocar lesão local e extensiva no tecido gástrico (Figura 16A). Os resultados obtidos mostram que os tratamentos com LYSO-7 (50 mg/kg) ou bezafibrato (50 mg/kg) diminuíram significativamente a porcentagem de área lesada quando comparado a animais tratados com veículo.

A indução da úlcera crônica em animais ANXA1$^{-/-}$ foi mais acentuada que a observada em animais WT (Figura 16C). O tratamento com LYSO-7 ou bezafibrato não foram tão eficientes em animais ANXA1$^{-/-}$ como em animais WT, uma vez que a porcentagem de redução da lesão gástrica causada tanto pelo bezafibrato como pela LYSO-7 foi menor em animais deficientes de ANXA1 (Figura 16B).

Figura 16. Efeitos do composto LYSO-7 na resolução da úlcera crônica induzida por ácido acético.

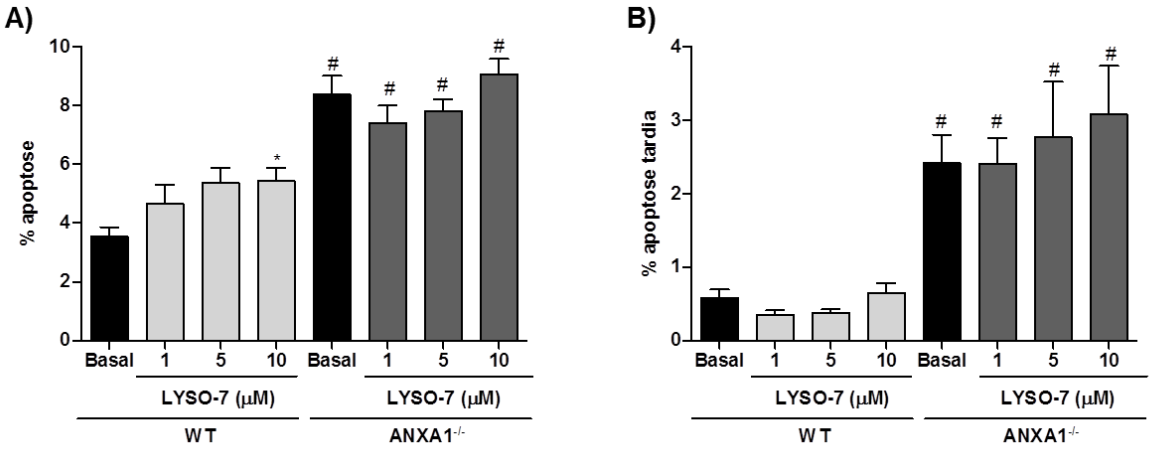


Camundongos machos Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ foram submetidos à indução de úlcera crônica por ácido acético. 24 h após do procedimento cirúrgico, os animais foram tratados com veículo, bezafibrato (50 mg/kg) ou LYSO-7 (50 mg/kg) durante sete dias e os animais foram sacrificados 24 h após a última dose dos tratamentos. A) Percentagem de área lesada; B) Percentagem de redução da lesão em relação ao veículo; C) imagem representativa do tecido gástrico. Dados expressos como média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. ***p<0,001 vs veículo WT ou vs mesmo grupo WT; $^{\&\&\&}$p<0,001 vs veículo ANXA1$^{-/-}$, $^{\#\#}$p<0,01 vs veículo WT. As setas pretas indicam a localização das lesões no tecido gástrico.

4.9 LYSO-7 induz a apoptose de neutrófilos

Dados obtidos pela técnica de citometria de fluxo, utilizando marcador de apoptose anexina V ou iodeto de propídio para necrose, mostram que o tratamento *in vitro* com LYSO-7, na dose de 10 µM, durante 24 horas aumenta o número de neutrófilos em apoptose (Figura 17A), sem alterar a porcentagem de células em apoptose tardia (Figura 17B). Neutrófilos provenientes de animais ANXA1$^{-/-}$ apresentaram maior porcentagem de neutrófilos em processo de apoptose e em apoptose tardia quando comparado a neutrófilos de animais WT. Os tratamentos com LYSO-7 não alteraram estes padrões de morte celular (Figura 17).

Figura 17. Efeitos do composto LYSO-7 sobre a apoptose de neutrófilos



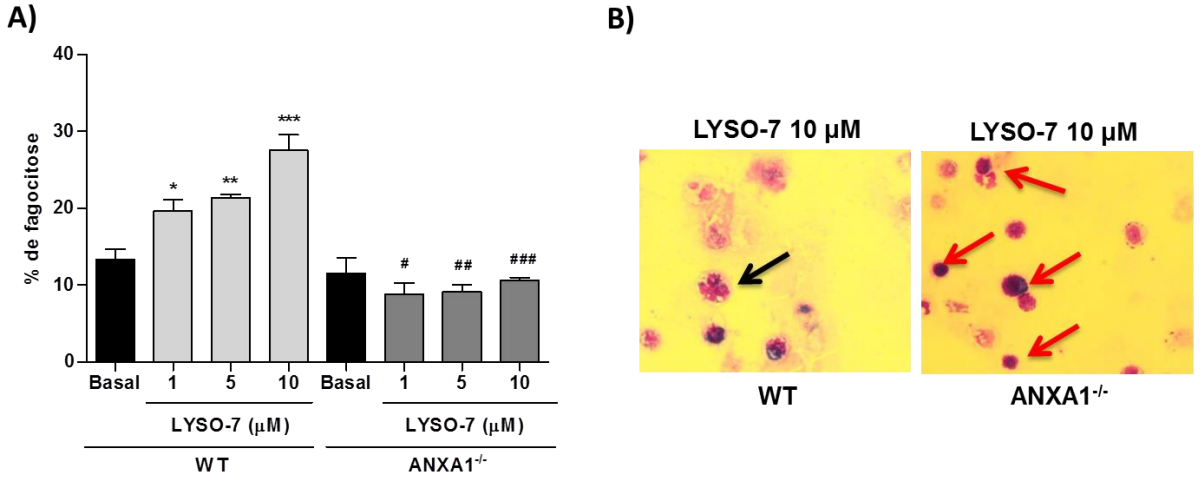
Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ 4 h após a injeção intraperitoneal de glicogênio de ostra (1%, 3 mL). Neutrófilos (1x10^{6}) foram incubados com veículo ou LYSO-7 (1, 5 e 10 µM) por 24 horas. Após este período os neutrófilos foram incubados com Anexina V e PI. Os resultados expressam média ± e.p.m. de células obtidas de 4 animais. A) Percentagem de apoptose; B) Percentagem de apoptose tardia. *p<0,05 vs basal; $^{\#}$p<0,05 vs respectivo valor no animal WT.

4.10 LYSO-7 aumenta a fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Efeito dependente de ANXA1

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que a LYSO-7 aumenta a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos peritoneais, de maneira dose-

dependente. Em macrófagos provenientes de animais deficientes de ANXA1, o tratamento com LYSO-7 não induziu aumento da atividade fagocítica (Figura 18A). O aumento do índice de fagocitose acarretado pela LYSO-7 pode ser evidenciado pelas imagens obtidas das lâminas de fagocitose de animais WT tratados com LYSO-7 (Figura 18B). Diferentemente, observa-se que macrófagos de animais deficientes de ANXA1 se aproximam de neutrófilos apoptóticos, porém não ocorre a fagocitose (Figura 18B).

Figura 18. Efeitos da LYSO-7 sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos.

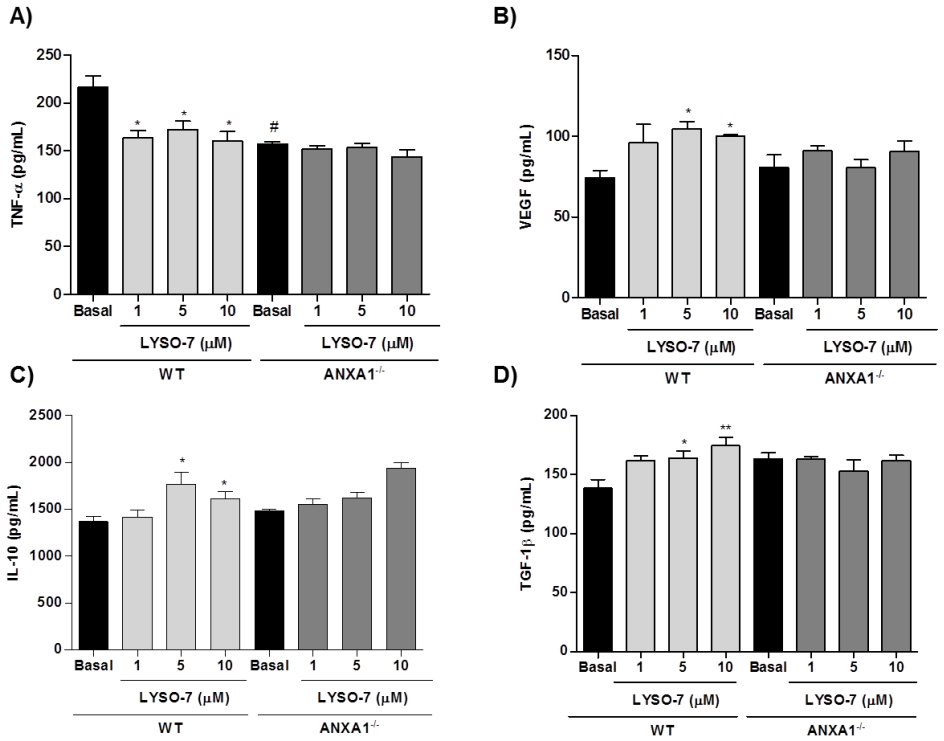


Macrófagos de animais Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ foram tratados ou não com LYSO-7 durante 1 hora. Os neutrófilos foram incubados por 18 horas para se tornarem apoptóticos e incubados com os macrófagos por 2 horas. A) Percentagem de fagocitose (indica o número de macrófagos que fagocitaram neutrófilos apoptóticos), mensurada por microscopia óptica; B) imagem ilustrativa do ensaio de fagocitose, a seta preta indica um macrófago que fogocitou neutrófilo apoptotico. A seta vermelha indica macrófagos que não fagocitaram neutrófilos apoptóticos. Dados expressos como média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs basal; $^{\#}$p<0,05; $^{\#\#}$p<0,01; $^{\#\#\#}$p<0,001 vs respectivo valor do animal WT.

4.11 LYSO-7 diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a liberação de citocinas pro-resolutórias.

Um importante fator na resolução do processo inflamatório é o bloqueio na liberação de mediadores pró-inflamatórios e o aumento na liberação de mediadores anti-inflamatórios (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). Neste contexto, foi mensurado a concentração de TNFα, IL-10, TGF-1β e VEGF no sobrenadante do ensaio de fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos peritoneais. Os dados obtidos mostram que o tratamento *in vitro* com LYSO-7 diminui a liberação de TNFα e aumenta a secreção de IL-10, TGF-1β e VEGF (Figura 19). Na cultura de macrófagos de animais deficientes de ANXA1, a LYSO-7 somente aumentou a secreção de IL-10, sem alterar TNFα, TGF-1β e VEGF (Figura 19).

Figura 19. Efeitos da LYSO-7 sobre a secreção de mediadores químicos por macrófagos peritoneais na vigência de fagocitose de neutrófilos apoptóticos.

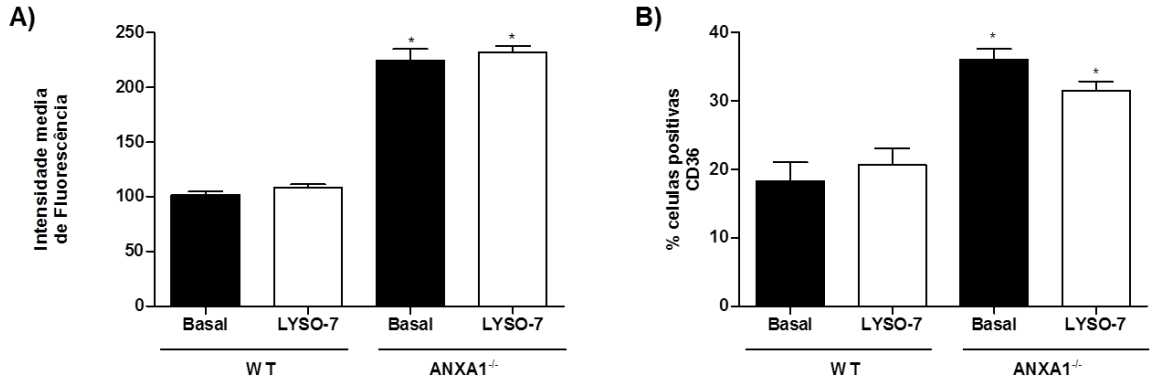


Macrófagos de animais Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ foram tratados ou não com LYSO-7 durante 1 hora. Os neutrófilos foram incubados por 18 horas para se tornarem apoptóticos e incubados com os macrófagos por 2 horas. A mensuração dos níveis de mediadores químicos foi realizada no sobrenadante do ensaio de fagocitose de neutrófilos apoptóticos. A) TNFα; B) VEGF; C) IL-10; D) TGF-1β. Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. *p<0,05, p<0,01 vs basal; $^{\#}$p<0,05 vs respectivo valor no animal WT.

4.12 O efeito da LYSO-7 sobre a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos não é dependente de CD36

O aumento na expressão de CD36 tem sido estabelecido como um mecanismo na fagocitose de células apoptóticas. Estudos recentes tem demostrado que agonistas PPARγ aumentam a fagocitose de células apoptóticas por aumentarem a expressão deste receptor (ASADA et al., 2004; OLAGNIER et al., 2011). No entanto, os dados obtidos mostram que o tratamento com LYSO-7 não provoca aumento na expressão deste receptor em macrófagos obtidos de animais WT e animais deficientes de ANXA1 (Figura 20).

Figura 20. Efeitos da LYSO-7 na expressão de CD36 em macrófagos.



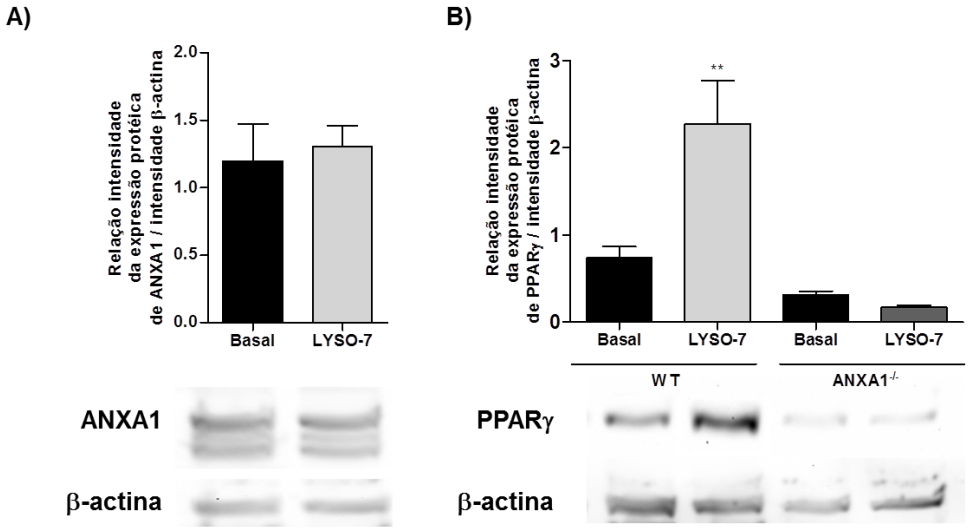
Macrófagos de animais Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ foram tratados ou não com LYSO-7 durante 1 hora. A mensuração da expressão de CD36 foi realizada por citometria de fluxo. A) Intensidade de fluorescência média; B) Percentagem de células positivas para CD36. Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. *p<0,05 vs respectivo valor no animal WT.

4.13 Efeitos da LYSO-7 sobre a expressão proteica de ANXA1 e PPARγ em macrófagos

Os dados obtidos mostram que o tratamento com LYSO-7 não provoca aumento na expressão proteica de ANXA1 em macrófagos. No entanto, o tratamento com LYSO-7, como esperado, aumentou a expressão de PPARγ. Porém, interessantemente, macrófagos provenientes de animais ANXA1$^{-/-}$ apresentam

menor expressão de PPARγ tanto em condição basal como tratada com LYSO-7 (Figura 21).

Figura 21. Expressão proteica de ANXA1 e PPARγ em macrófagos.

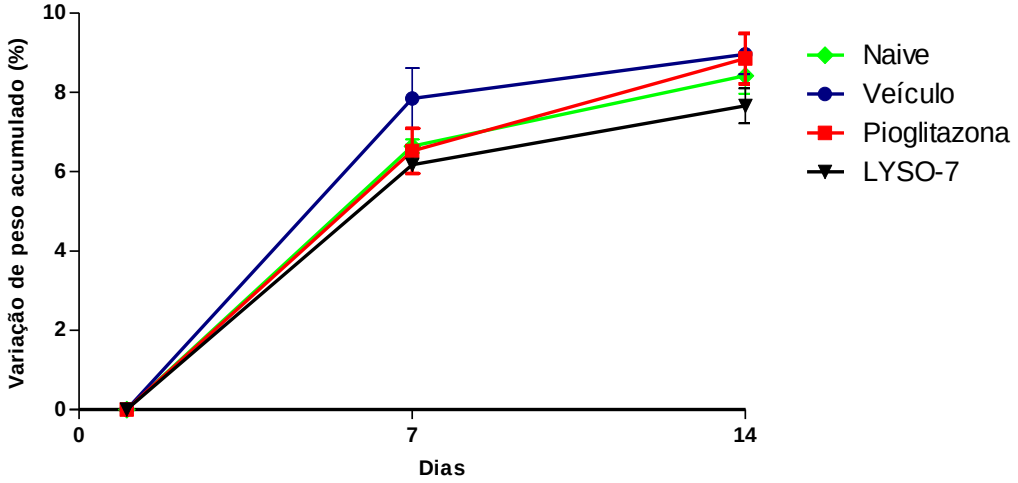


Macrófagos de animais Balb/C WT e ANXA1$^{-/-}$ foram tratados ou não com LYSO-7 durante 1 hora. (A) expressão proteica de ANXA1 e imagem representativa do gel de eletroforese; B) expressão proteica de PPARγ e imagem representativa do gel de agarose. Resultados expressos como media ± e.p.m. de 4 animais em cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. **p<0,05 vs respectivo basal.

4.14 LYSO-7 não provoca alterações toxicológicas agudas

Durante as primeiras 4 horas de observação pós-administração de LYSO-7 ou pioglitazona (2000 mg/kg, v.o.) não foram verificadas alterações como irritabilidade, resposta ao toque, contorção, alterações no trem posterior ou tônus corporal, tremores, convulsões, movimento de straub, hipnose, sinais de anestesia, aumento ou diminuição de defecação, piloereção ou cianose. Não foram encontradas alterações relevantes nas vísceras dos animais. Exames histopatológicos não foram necessários, uma vez que não foram observadas alterações na autópsia. Ainda não foram observadas variações de peso acumulado durante os 14 dias do experimento (Figura 22).

Figura 22. Variação de peso em animais submetidos ao ensaio de toxicologia aguda dose-fixa.

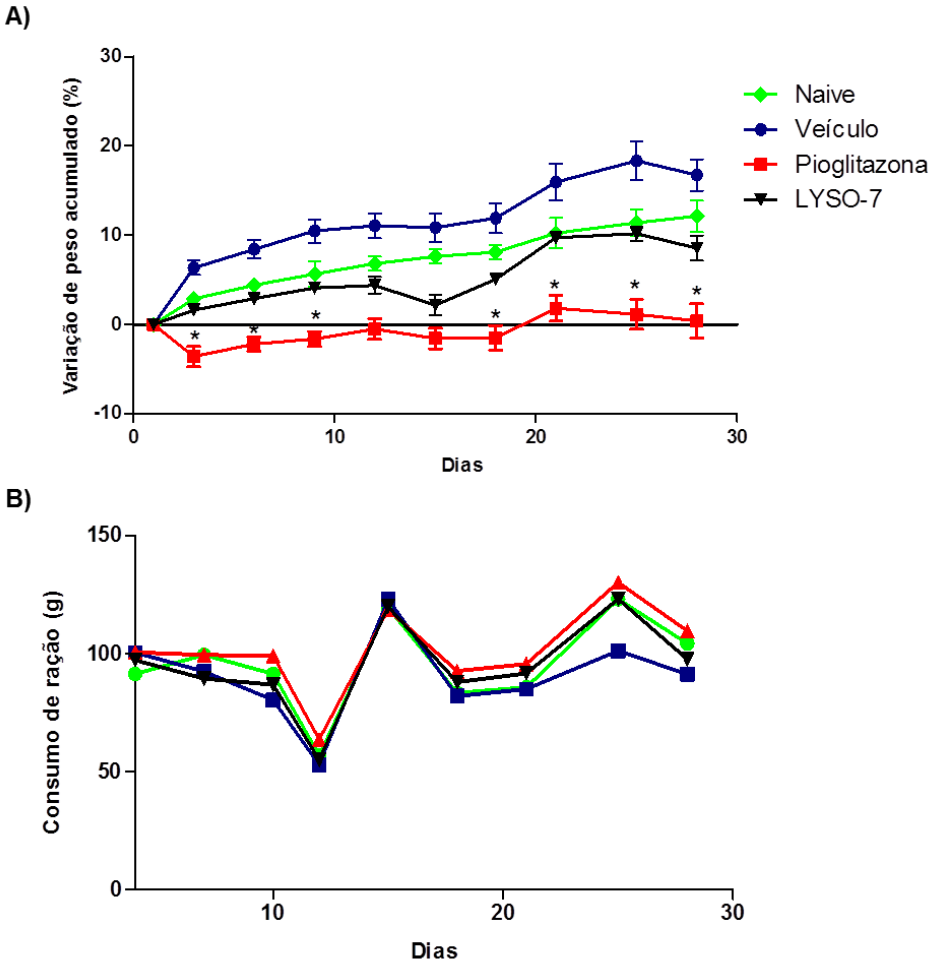


Camundongos Swiss machos foram tratados com uma única dose (2000 mg/kg, v.o.) de LYSO-7 ou pioglitazona. Os animais foram pesados no 1º, 7 e 14º dia. Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

4.15 LYSO-7 não provoca alterações no modelo de toxicologia crônica de doses-repetidas

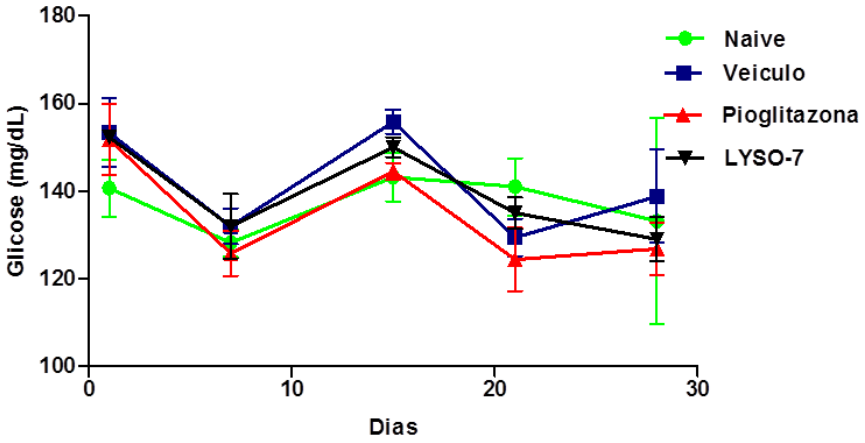
O tratamento crônico por 28 dias com LYSO-7 não provocou alterações significativas na porcentagem de peso acumulado, consumo de ração (Figura 23A e B) e na concentração de glicose (pós-prandial) (Figura 24). No entanto, animais tratados com pioglitazona apresentaram diminuição na variação de peso acumulado quando comparado a animais naive e tratados com veículo (Figura 23A).

Figura 23. Variação de peso acumulado em animais tratados durante 28 dias com veículo, pioglitazona ou LYSO-7.



Camundongos Swiss machos foram tratados uma vez ao dia durante 28 dias com LYSO-7 (50 mg/kg, v.o.) ou pioglitazona (50 mg/kg, v.o). O peso dos animais e a quantidade de ração consumida foi avaliada a cada 3 dias. A) Variação de peso acumulado; B) Consumo de ração. Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. *p<0,05 vs veículo.

Figura 24. Variação na glicose pós-prandial de animais submetidos ao ensaio toxicológico de doses repetidas.



Camundongos Swiss machos foram tratados uma vez ao dia durante 28 dias com LYSO-7 (50 mg/kg, v.o.) ou pioglitazona (50 mg/kg, v.o). a cada 7 dias era realizada a mensuração da glicemia pós-prandial. Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Os parâmetros hematológicos relacionados à classe eritrocitária não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (Tabela 2). Na análise dos parâmetros leucocitários, foi possível verificar que o tratamento com veículo, pioglitazona ou LYSO-7 ocasiona diminuição no número de leucócitos totais, diferença resultante da diminuição no número de linfócitos e neutrófilos presentes no sangue circulante (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças na quantidade total de leucócitos na medula óssea dos animais submetidos ao ensaio (dados não mostrados).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos relacionadas à classe eritrocitária em animais submetidos ao ensaio toxicológico crônico de doses-repetidas.

Grupos	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	MCV
	$10^6/mm^3$	g/dL	%	$10^3/mm^3$	fm^3
Naive	8,40 ± 0,33	14,25 ± 0,63	39,80 ± 1,82	1183 ± 88,61	48,5 ± 0,85
Veículo	8,12 ± 0,22	14,20 ± 0,20	38,35 ± 0,75	1109 ± 72,10	47,5 ± 0,47
Pioglitazona	8,29 ± 0,34	14,20 ± 0,54	39,20 ± 1,87	1100 ± 25,62	47,0 ± 0,73
LYSO-7	7,36 ± 0,23	13,90 ± 0,18	39,30 ± 1,04	1390 ± 104,3	47,0 ± 0,20

Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos relacionados à classe leucocitária em animais submetidos ao ensaio toxicológico crônico de doses-repetidas.

Grupos	Leucócitos	Neutrófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Linfócitos
	$10^3/mm^3$	%	$10^3/mm^3$	%	$10^3/mm^3$
Naive	3,20 ± 0,28	21 ± 2,73	0,56 ± 0,03	77,5 ± 2,86	2,57 ± 0,26
Veículo	1,95 ± 0,26*	18 ± 0,85	0,34 ± 0,05*	80,5 ± 0,94	1,60 ± 0,20*
Pioglitazona	1,80 ± 0,46*	15 ± 3,55*	0,39 ± 0,07*	84,0 ± 3,35	1,45 ± 0,41*
LYSO-7	1,80 ± 0,20*	19 ± 2,15	0,37 ± 0,04*	81,0 ± 2,15	1,42 ± 0,16*

Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. *$p<0,05$ vs naive.

Quanto aos parâmetros bioquímicos avaliados, foi possível verificar que o tratamento com LYSO-7 ou pioglitazona provoca aumento nos níveis de triglicerídeos após 28 dias de tratamento quando comparado a animais do grupo veículo. No entanto, o tratamento com LYSO-7 ou pioglitazona ocasionou aumento

nos níveis de HDL (Tabela 4). Para os demais parâmetros avaliados não foram encontradas diferenças significativas.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de animais submetidos ao ensaio toxicológico crônico de doses-repetidas.

Grupos	ALT U/L	Gama GT U/L	Glicose mg/dL
Naive	76,50 ± 13,12	51,00 ± 9,29	152 ± 9,68
Veículo	58,00 ± 4,48	69,50 ± 10,46	186 ± 18,71
Pioglitazona	67,00 ± 9,77	47,00 ± 7,58	150 ± 8,68
LYSO-7	88,00 ± 11,01	77,00 ± 3,92	150 ± 13,56

Grupos	Triglicerídeos mg/dL	Colesterol Total mg/dL	HDL mg/dL	LDL mg/dL	VLDL mg/dL
Naive	71,50 ± 23,80	107 ± 18,85	59 ± 7,96	38,40 ± 3,27	14,30 ± 4,76
Veículo	75,00 ± 17,11	136 ± 4,52	51 ± 1,19	50,00 ± 6,41	15,00 ± 3,42
Pioglitazona	136,00 ± 20,99#	117 ± 18,29	72 ± 2,97*	28,80 ± 5,34	27,20 ± 4,19
LYSO-7	168 ± 25,84#	140 ± 8,90	74 ± 5,73*	27,60 ± 3,57#	23,40 ± 6,12

Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. *$p<0,05$ vs naive; #$p<0,05$ em vs veículo.

Análise histológica do coração, pulmão, baço, fígado, rim, estômago, intestino e pâncreas foram realizados, no entanto nenhuma alteração morfológica foi encontrada em animais tratados com veículo, LYSO-7 ou pioglitazona (dados não mostrados).

4.16 LYSO-7 não provoca efeitos mutagênicos em eritrócitos policromáticos da medula óssea.

A partir dos dados obtidos não foram encontradas diferenças em animais tratados com uma única dose de 2000 mg/kg de LYSO-7 ou pioglitazona no número e porcentagem de micronúcleos quando comparados a animais naive ou tratados com veículo (Tabela 5). Apenas o grupo controle positivo MMS 50 mg/kg, como já esperado, apresentou efeitos tóxicos. Não foram observados resultados significantes no percentual entre eritrócitos policromáticos e monocromáticos (dados não mostrados).

Tabela 5. Percentagem de eritrócitos policromáticos (EPC) micronúcleos (EPCMN) no teste de micronúcleos realizado com LYSO-7 e pioglitazona.

Grupo	**Dose**	**EPCMN/1000 EPC**	
	(mg/kg)	**Número**	**%**
Naive	-	3,25 ± 0,96	0,32 ± 0,09
Veículo	-	4,33 ± 0,49	0,43 ± 0,04
LYSO-7	2000	3,66 ± 0,55	0,36 ± 0,05
Pioglitazona	2000	5,16 ± 0,90	0,51 ± 0,09
MMS	50	41,63 ± 2,24*	4,16 ± 0,22*

Dados expressos como média ± e.p.m. de cinco animais por grupo. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida dos pós-teste de Tukey. *p<0,05 vs naive.

5 DISCUSSÃO

Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da úlcera gástrica são limitados à inibição da secreção de ácido gástrico pelas ações de inibidores da bomba de prótons e antagonista de histamina do tipo-2 (KRZNARIC et al., 2011). Além de apresentarem um único mecanismo de ação, estes fármacos apresentam uma série de efeitos adversos, por este motivo há um esforço na busca por novas estratégias farmacológicas. Desta forma, utilizando diferentes modelos experimentais de úlcera gástrica, os dados obtidos no presente trabalho mostram que a molécula indol-tiazolidínica agonista PPAR pan e inibidora de COX, denominada LYSO-7, não altera os parâmetros de secreção gástrica, no entanto promove gastroproteção por inibir o influxo de neutrófilos para o foco de lesão e manter o fluxo sanguíneo na rede microcirculatória do estômago, efeito este mediado pelo NO. Adicionalmente, a LYSO-7 atua na resolução do processo inflamatório promovendo *downregulation* na secreção de mediadores inflamatórios, apoptose e eferocitose de neutrófilos apoptóticos.

O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) desenhou e sintetizou a molécula denominada LYSO-7, ([5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)–tiazolidina-2,4-diona)]), com o intuito de atuar como um agonista PPAR e inibidor de COX-1 e COX-2. Uma série de ensaios in silico, *in vitro* e *in vivo* foram realizados para caracterizar a LYSO-7. O efeito das moléculas tiazolidínicas ocorre pela ligação da região 2,4-diona ao receptor do ácido retinóide (RXR), acoplado aos PPARs para formar complexos heterodiméricos, o qual se liga a elementos responsivos (PPRE), e leva a regulação da transcrição de genes (VAN BEEKUM et al., 2009; DREIJERINK et al., 2009). Esta interação entre o composto LYSO-7 e o receptor, bem como com as enzimas da COX, foi confirmado em estudos de *docking* molecular. Ainda, ensaios de ativação transcricional mostraram que o composto LYSO-7 liga-se as três isoformas PPARα, PPARβ/δ e PPARγ, sendo assim caracterizado como um agonista PPAR pan. Apesar do fato do composto LYSO-7 ser um agonista PPAR pan, com fraco efeito agonista sobre receptores PPARγ, o efeito anti-inflamatório do composto LYSO-7 em neutrófilos é mediado principalmente pela ativação de PPARγ, uma vez que a diminuição da secreção de IL-1β e NO foi inibida pela incubação com GW9962 (SANTIN et al., 2013a), como já

salientado, um antagonista de PPARγ amplamente empregado para a identificação do mecanismos de ação de novas moléculas (TAKAGI et al, 2004; REDDY et al., 2008; NAITO & YOSHIKAWA, 2010; LIM et al., 2012; MARTIN et al., 2012). Dados da literatura sugerem que a ativação parcial de receptores PPARγ, ao invés da sua total ativação, possa ser uma estratégia importante para melhorar a sensibilidade à insulina e evitar efeitos desfavoráveis da ativação PPARγ (COCK et al, 2004; AMATO & NEVES, 2012). Assim, os estudos aqui conduzidos foram realizados para validar a possível aplicação terapêutica do composto LYSO-7. Assim, verificamos a citoproteção causada pelo LYSO-7 na úlcera gástrica induzida pela solução de Et/HCl e confirmamos os dados obtidos *in vitro*, uma vez que o tratamento com LYSO-7 ocasionou aumento na expressão proteica e gênica do receptor PPARγ no estômago de animais e, ainda, o efeito citoprotetor da LYSO-7 *in vivo* foi inibido pelo pré-tratamento com GW9962 (SANTIN et al., 2013b).

Baseado nos efeitos da LYSO-7 e na gênese da úlcera gástrica, onde o influxo de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos, tem sido descrito como um suposto indutor do processo lesivo (WALLACE et al., 1995; BESERRA et al., 2011), nos levou a estudar os mecanismo moleculares envolvidos na citoproteção apresentada pela LYSO-7. A participação dos neutrófilos na lesão provocada pela administração de Et/HCl foi pela primeira vez evidenciada a partir do resultados obtidos neste trabalho. A indução da úlcera gástrica com Et/HCl provocou uma lesão com característica necrótica e com acúmulo de neutrófilos no tecido gástrico, já animais depletados de neutrófilos com anticorpo anti-granulócito apresentaram significativa redução na área lesada (SANTIN et al., 2013b). Juntos, esses dados corroboram que a inibição do recrutamento de neutrófilos possa ser um importante alvo na terapia antiúlcera (BAYIR et al., 2006; ROCHA et al., 2011), mecanismo este apresentado pela LYSO-7, uma vez que animais tratados com LYSO-7 apresentaram menor migração de neutrófilos para o tecido gástrico (SANTIN et al., 2013b).

Vários estudos tem demonstrado o papel da ativação PPAR no influxo de neutrófilos em diferentes modelos de inflamação sendo que a maioria dos trabalhos mostra um efeito inibitório sobre o processo (CELINSKI et al., 2011; LONG et al., 2011; FARNESI-DE-ASSUNÇÃO et al., 2012). A migração de neutrófilos para o foco inflamatório é um evento complexo e altamente controlado por uma série de

mediadores químicos (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Inicialmente a migração de neutrófilos depende de interações moleculares entre as membranas dos leucócitos circulantes e das células endoteliais, que são mediados pela expressão de moléculas de adesão na superfície de ambas às células. A CD62L medeia o *rolling* de neutrófilos na margem do endotélio vascular e interage com carboidratos constitutivos ou com CD62P e CD62E expressas nas células endoteliais (GREEN et al., 2003, 2004; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). A CD62L é clivada pela ação de metaloproteases sinalizando para uma posterior firme adesão ao endotélio, a qual é mediada por moléculas da família das integrinas, especialmente a CD18, que é expressa por leucócitos e interage com uma diversidade de componentes da membrana endotelial e moléculas da superfamília de imunoglobulinas. Por fim, os neutrófilos transmigram entre as junções endoteliais através de interações heterofílicas e homofílicas de moléculas da superfamília de imunoglobulinas como, por exemplo, CD31 (PECAM-1), para subsequente migração para o foco inflamatório (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Os efeitos apresentados pelos agonistas PPAR envolvem a direta inibição da interação leucócito endotélio e a quimiotaxia (IMAMOTO et al., 2004; LIANG et al., 2010), bem como a secreção de mediadores quimiotáxicos (RICOTE et al., 1998; REILLY et al., 2000; WANG et al., 2001). De fato, um estudo realizado em paralelo em nosso laboratório demostrou que a LYSO-7 atua diretamente sobre as funções adesivas e locomotoras de neutrófilos, pela diminuição do número de leucócitos em comportamento *rolling* e aderidos ao endotélio microvascular do mesentério de ratos após aplicação do fMLP. Estes efeitos podem ser dependentes da ação do LYSO-7 sobre a expressão de moléculas de adesão e sobre os mecanismos da locomoção orientada, já que a incubação de neutrófilos com a LYSO-7 inibiu a expressão gênica e proteica de CD62L e CD18, a quimiotaxia, o influxo de cálcio e a ativação do NFκB em neutrófilos estimulados com fMLP (SANTIN et al., em anexo). Ainda, os resultados obtidos no presente trabalho mostram, pela primeira vez, que um agonista PPAR afeta o trafego de neutrófilos da medula óssea para o sangue, uma vez que a mobilização de neutrófilos maduros medulares para o sangue que ocorreu durante o desenvolvimento da úlcera gástrica foi abolida em animais tratados com LYSO-7 (SANTIN et al., 2013b).

Interessantemente, os efeitos sobre a migração de neutrófilos não foram modificados em animais pré-tratados com L-NAME, um antagonista inespecífico das NOS. Porém, de maneira diferente, a manutenção do fluxo sanguíneo na superfície

da rede microcirculatória da mucosa gástrica evocada pelo tratamento com LYSO-7 ocorre via NO e, esta parece ser dependente da reduzida e elevada expressão proteica de iNOS e eNOS, respectivamente. O papel benéfico do NO na úlcera gástrica foi elucidado em estudos *in vivo* empregando bloqueadores da síntese de iNOS e eNOS, sendo que o bloqueio da eNOS favoreceu o desenvolvimento de lesão gástrica, e o tratamento com doadores de NO foi capaz de reverter o efeito lesivo (GUO et al., 2006; KATO et al., 2009; EL-DEMERDASH et al., 2010). A maioria dos trabalhos descritos na literatura concluem que o equilíbrio entre a síntese de iNOS/eNOS é capaz de proteger a mucosa gástrica de lesões (GUO et al., 2006; MA & WALLACE, 2000; GUHA et al., 2010). Os resultados aqui obtidos corroboram estes dados, uma vez que o composto LYSO-7 promoveu aumento na expressão proteica de eNOS e diminuição da expressão proteica de iNOS no tecido gástrico. Da mesma forma, a rosiglitazona, um conhecido agonista PPARγ, induziu aumento na expressão de eNOS no tecido renal após isquemia e reperfusão (BETZ et al., 2012), o telmisartan, um agonista PPARγ e bloqueador do receptor de angiotensina do tipo II, diminuiu a resistência vascular na artéria mesentérica de ratos, dependente da indução da expressão de eNOS (YUEN et al., 2011), e o papel antidepressivo e anticonvulsivante da pioglitazona também está relacionado a maior expressão de eNOS no cérebro (SADAGHIANI et at., 2011).

O estresse oxidativo é definido como uma perturbação da homeostasia oxidante-antioxidante, e este desequilíbrio leva a formação de ROS, sendo as principais o ânion superóxido e o radical hidroxila, os quais podem levar a lesão celular (OCK et al., 2012). Ainda, as espécies reativas formadas a partir da ação do ácido gástrico podem alterar vias de sinalização como a MAPK, NFκB e STAT3 (SOUZA et al., 2002; ABDEL-LATIF et al., 2004; DVORAK et al., 2007; TAMURA et al., 2013). Assim como o ácido gástrico, a administração de Et/HCl ocasiona aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no estômago, a qual tem papel crucial no desenvolvimento de úlceras gástricas. Este aumento é evidenciado principalmente pela depleção da glutationa e liberação de ânions superóxido (HIRAISHI et al., 1999). Além disso, a administração de etanol afeta também o sistema enzimático de defesa antioxidante endógeno, provocando redução na atividade das enzimas GPx, GR e GST (RUKKUMANI et al., 2004). Este ciclo “redox” da glutationa exerce um papel fundamental na mucosa gástrica, prevenindo o

surgimento de lesões provocadas pela administração de etanol. Os dados aqui apresentados corroboram esse mecanismo na gênese da úlcera gástrica, e mostram que o tratamento com LYSO-7 é eficaz na manutenção do ciclo-redox. Os efeitos provocados pela LYSO-7 são principalmente decorrentes do aumento na atividade da catalase, que favorece a metabolização do peróxido de hidrogênio em água (OSHINO et al., 1973); inibição da atividade da SOD, o que pode gerar concentrações menores de peróxido de hidrogênio, agente com maior atividade citotóxica que o composto original (YASUI & BABA, 2006; CHANDEL & BUDINGER, 2007) e o reestabelecimento da atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR.

A formação da úlcera gástrica é decorrente do desequilíbrio de fatores protetores e agressores. PGE2 e PGI2 produzidas no estômago pela COX-1 desempenham um importante papel na proteção do epitélio gástrico, por aumentar a secreção de muco e bicarbonato e também reduzir a migração leucocitária (WALLACE, 2008). Indometacina e outros AINES inibem a síntese de prostaglandinas a partir do bloqueio da COX-1 nas células epiteliais gástricas, sendo este o mecanismo proposto para explicar o efeito ulcerogênico dos AINES. Nossos dados mostram que o pré-tratamento com LYSO-7 reduz a lesão gástrica provocada pela administração de indometacina, além de inibir a migração de neutrófilos para o tecido gástrico lesado, corroborando dados obtidos no modelo de úlcera aguda induzida por Et/HCl. Ainda, o composto LYSO-7 não previne a diminuição na concentração de PGE2 no tecido gástrico, o que indica que este composto atua independente desta via. Provavelmente, como já demostrado anteriormente, o mecanismo gastroprotetor compreende a inibição da migração de células inflamatórias para o foco inflamatório. Desta forma, a menor concentração dos mediadores inflamatórios observados nos tecido gástrico lesionado pode refletir o menor número de células infiltradas.

Tradicionalmente, a terapia antiúlcera tem focado em estratégias que diminuem a liberação de ácido gástrico. Porém, estas terapias não têm como mecanismo de ação inibir o processo inflamatório gerado pela lesão ulcerativa gástrica. No entanto, passado alguns anos, tem sido reconhecido que novas estratégias terapêuticas para processos inflamatórios em geral baseadas na pró-resolução possuem potencial para o tratamento de várias condições inflamatórias, entre elas a úlcera gástrica. De fato, a resolução da inflamação e considerada um processo alvo, que é distinto do processo de inflamação aguda (LEE et al., 2012;

ALESSANDRI et al., 2013; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). Com base nos resultados anteriores que claramente mostraram a participação de neutrófilos na gênese da úlcera gástrica nos dois modelos aqui empregados e que a LYSO-7 inibe o influxo de neutrófilos na etapa inicial do desenvolvimento da lesão, investigamos, também, se a LYSO-7 poderia ser efetiva nos eventos de resolução da inflamação. Assim, empregamos o modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético. Este modelo é o que reproduz com maior realidade a úlcera gástrica humana, o ensaio consiste na aplicação de uma injeção de ácido acético na camada subserosa da parede externa do estômago provocando uma lesão profunda e necrótica (DE PAULA et al., 2006). Neste modelo experimental, os tratamentos com LYSO-7 ou bezafibrato, durante sete dias, iniciado 24 horas após o início do processo, levaram a redução significativa na área lesada.

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos neste processo, investigamos, inicialmente, se a LYSO-7 poderia atuar via proteína ANXA1, que como salientado na Introdução, é uma proteína abundante no citoplasma de neutrófilos, macrófagos e monócitos, e quando os leucócitos são ativados, a ANXA1 é secretada por diferentes mecanismos, sofre fosforilação dependente de cálcio, e assim interage com receptores FPR2/ALXR para controlar a adesão e migração, além de promover a apoptose de neutrófilos e mediar o *clearence* de neutrófilos por macrófagos, desempenhando um papel fundamental na resolução do processo inflamatório (COORAY et al., 2013). Assim, observamos que a resolução da úlcera gástrica foi menor nestes animais, sugerindo a participação da proteína ANXA1 na ação resolutiva do composto LYSO-7.

Atualmente a resolução do processo inflamatório pode ser dividida em três fases: *downregulation* na sinalização pro-inflamatória, apoptose de neutrófilos e a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos seguida da migração para os linfonodos (LEE & SURH, 2012; ALESSANDRI et al., 2013). O papel da LYSO-7 nas fases do processo de resolução, bem como o envolvimento da ANXA1 nos efeitos da LYSO-7 passaram a ser estudadas em ensaios *in vitro*. Os dados obtidos mostram que o composto LYSO-7 induz a apoptose de neutrófilos e que este efeito pode não ser mediado pela ANXA1, já que a elevada apoptose em neutrófilos obtidos de animais ANXA1$^{-/-}$ não foi modificada pela LYSO-7. A literatura tem mostrado que células apoptóticas induzem e ativam receptores PPARβ/δ, aumentando a secreção de opsoninas, moléculas que fazem a ponte entre as

células apoptóticas e os receptores de fagocitose (MUKUNDAN et al., 2009). Este dado é bastante interessante, pois a ANXA1 é uma importante proteína sinalizadora de *eat me*, que são marcadores de superfície que identificam uma célula em processo de morte (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). A apoptose celular assegura a eficiente remoção dos neutrófilos do tecido antes da ruptura da membrana e liberação de mediadores citotóxicos, minimizando os danos ao tecido e a perpetuação da resposta inflamatória (ALESSANDRI et al., 2013)

A deficiência na eliminação de neutrófilos apoptóticos tem sido associada com a autoimunidade e inflamação crônica e a remoção eficiente destas células apoptóticas por macrófagos é crucial para a resolução do processo inflamatório (ALESSANDRI et al., 2013). Os dados aqui obtidos mostram que a LYSO-7 favorece a eferocitose, o que não foi observado em macrófagos deficientes de ANXA1. Em conjunto, estes resultados mostraram que os efeitos de agonistas PPAR sobre a eferocitose poderiam estar diretamente ligados a ANXA1. De fato, a ANXA1 é um importante mediador na sinalização de *eat me* do neutrófilo apoptótico com os receptores no macrófago, sendo responsável, por exemplo, pela ligação da fosfatidil serina ao seu receptor (ARUR et al., 2003). É importante ressaltar que esta é a primeira vez que se reporta o papel da ANXA1 nos efeitos dos agonista PPAR na fagocitose de neutrófilos apoptóticos.

O aumento na fagocitose evocado pelo tratamento com LYSO-7 pode ser decorrente do aumento na expressão de receptores, como a fosfatidil serina e CD36, que são importantes na sinalização de *eat me*. Trabalhos da literatura tem demostrado que agonistas PPAR induzem a expressão de CD36, com consequente aumento na atividade fagocítica (ZHAO et al., 2009; OLAGNIER et al., 2011; ROSZER et al., 2011). Porém, os resultados obtidos mostraram que a LYSO-7 não aumenta a expressão de CD36 em macrófagos provenientes de animais WT ou deficientes de ANXA1. Interessantemente, a expressão de CD36 em animais ANXA1$^{-/-}$ foi maior do que a verificada em animais WT. Este resultado não era esperado uma vez que a CD36 é uma molécula que favorece a fagocitose que está reduzida em animais ANXA1$^{-/-}$. Porém, não há dados na literatura que permitam uma discussão mais aprofundada e resultados adicionais são necessários para aquilatar a importância deste efeito.

Após a eferocitose, os macrófagos sinalizam a inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, e passam a sinalizar para secreção de citocinas anti-

inflamatórias, mediadores lipídicos e fatores de crescimento (FADOK et al., 1998). Os dados obtidos no sobrenadante do ensaio de fagocitose mostram que o tratamento com LYSO-7 promoveu a diminuição nos níveis de TNFα e aumento na liberação de IL-10, TGF-1β e VEGF. Diferentemente, este efeito não foi observado no sobrenadante do ensaio de fagocitose utilizando macrófagos de animais deficientes de ANXA1.

Os efeitos apresentados por macrófagos de animais WT tratados com LYSO-7 são, de acordo com a literatura, característicos de macrófagos em fase de resolução, uma vez que estes passam a secretar TGF-1β, que é uma molécula chave no *clearance* de células inflamatórias e no retorno da homeostasia do tecido (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). O TGF-1β contribui para a regeneração tecidual e na cicatrização principalmente por promover: 1) a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos; 2) expressão de inibidores de metaloproteínases que regulam o remodelamento da matriz extracelular; 3) síntese de colágeno (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). Macrófagos em fase de resolução também passam a secretar VEGF, um importante fator de crescimento, assegurando a angiogênese e a restauração do fornecimento de oxigênio para o tecido (KNIGHTON et al., 1983).

O envolvimento da ANXA1 nas ações da LYSO-7 foi corroborado pela quantificação de mediadores anti-inflamatórios durante a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos peritoneais obtidos de animais ANXA1$^{-/-}$, uma vez que a secreção de TNFα, IL-10, TGF-1β e VEGF não foram modificadas na vigência de tratamento com LYSO-7. Com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos duas hipóteses foram levantadas. Inicialmente inferimos, que a LYSO-7, após ligar-se ao receptor PPARγ, promoveria aumento na produção e secreção de ANXA1 por macrófagos. No entanto esta hipótese não foi confirmada, pois o tratamento com LYSO-7 não aumentou a expressão proteica de ANXA1 em macrófagos de animais WT. A segunda hipótese aventada seria modificações na expressão ou ativação de PPAR em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$. Surpreendentemente, o resultado obtido mostrou que macrófagos peritoneais de animais ANXA1$^{-/-}$ apresentam expressão proteica reduzida de PPARγ em condições basais e, esta diferença se mantém na vigência de tratamento com o composto LYSO-7 quando comparado a macrófagos provenientes de animais WT. Consideramos este resultado muito interessante, considerando a importância da ANXA1 e do PPAR na homeostasia e na regulação

de diferentes processos fisiopatológicos. Desta forma, esforços do laboratório têm sido realizados na tentativa de elucidar o mecanismo desta interação.

De acordo com Balakumar et al. (2007) a ativação PPAR pan amplifica os efeitos terapêuticos e reduz os efeitos adversos comuns em agonistas específicos, por isto possíveis efeitos tóxicos do composto LYSO-7 foram avaliados utilizando o ensaio toxicológico agudo de dose-fixa. Neste ensaio foi possível verificar que o composto LYSO-7, bem como a pioglitazona, não apresentaram qualquer alteração significativa no comportamento, bem como na avaliação macroscópica dos órgãos 24 horas e 14 dias após a administração de 2000 mg/kg. A metodologia empregada descrita pela OECD 420 (2001) permite uma classificação toxicológica aguda, utilizando o sistema de harmonização global (GSH), sem pré-determinação de DL50. Quando nenhuma morte e observada no decorrer do experimento, o GSH indica que a substância ou mistura de substâncias que foram testadas até a categoria 4 (2000 mg/kg), é classificada na categoria 5 ou baixa toxicidade aguda, com DL50 superior a 2000 mg/kg. Excepcionalmente, e apenas quando justificado por necessidades legais específicas, o uso de um ensaio adicional utilizando dose fixa de 5000 mg/kg pode ser considerado (OECD 420, 2001). No ensaio toxicológico de doses-repetidas, onde os animais foram tratados diariamente com LYSO-7 (50 mg/kg) ou pioglitazona (40 mg/kg) durante 28 dias, os tratamentos ocasionaram diminuição no número total de leucócitos no sangue periférico, a diminuição foi dependente de um menor número de neutrófilos e linfócitos, no entanto, a diminuição não foi severa e os valores não ficaram fora dos valores considerados normais. Quanto à variação de peso, animais tratados com pioglitazona apresentam diminuição na porcentagem de ganho de peso, sem alterar o consumo de ração, durante o experimento, este efeito não foi verificado com o composto LYSO-7.

Um importante fator a ser avaliado, principalmente tratando-se de novos compostos, são seus efeitos mutagênicos. O ensaio micronúcleo é um teste citogênetico que permite detectar possíveis aberrações cromossômicas em células previamente expostas a agentes químicos. O experimento é baseado na avaliação do aumento na frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleo (KRISHNA & HAYASHI, 2000). Os dados obtidos mostram que o composto LYSO-7 e pioglitazona não apresentam efeitos mutagênicos em eritrócitos policromáticos utilizando a dose de 2000 mg/kg, quando comparado a animais tratados com MMS, um conhecido agente que provoca aberrações cromossômicas.

Juntos, os dados obtidos mostram que a molécula indol-tiazolídinica LYSO-7, atua como agonista PPAR pan, tendo seu efeito anti-inflamatório e antiúlcera *in vivo* mediados pela ativação do receptor PPARγ, modula a migração de neutrófilos e o fluxo sanguíneo na microcirculação do tecido gástrico lesionado. Ainda, a transativação e transrepressão de eNOS e iNOS, respectivamente, parece ser um mecanismo eficaz na homeostase vascular. Além destes efeitos, a LYSO-7 atua na resolução do processo inflamatório promovendo *downregulation* na secreção de mediadores inflamatórios, apoptose e eferocitose de neutrófilos apoptóticos, sem apresentar efeitos toxicológicos nos modelos empregados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o tratamento com LYSO-7:

1) Diminui, de maneira dose-dependente, a lesão do tecido gástrico provocada pela administração de Et/HCl, sendo o efeito dependente da atividade PPARγ;
2) Não altera os parâmetros de secreção gástrica;
3) Inibe o influxo de neutrófilos para o foco de lesão no tecido gástrico;
4) Inibe a estase microvascular provocada pela administração de Et/HCl, efeito dependente de NO; evidenciado pela diminuição da expressão de iNOS e aumento na expressão de eNOS;
5) Reestabelece a atividade das enzimas antioxidantes no modelo de úlcera induzida por Et/HCl.

Em conjunto estes dados mostram que a LYSO-7 é citoprotetor no modelo de ulcera gástrica induzida pelo Et/HCl, dependente da atividade PPARγ e da inibição do influxo neutrofílico e do balanço das atividades de eNOS e iNOS no tecido gástrico;

6) Promove citoproteção no modelo de úlcera induzida por indometacina, sendo que a diminuição da concentração de TNFα e o aumento dos níveis de IL-10 no tecido gástrico podem estar envolvidos no efeito observado;
7) Diminui a área lesada no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético, efeito este dependente de ANXA1;
8) Induz a apoptose de neutrófilos proveniente de animais WT e estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos proveniente de animais WT ; efeitos não observados em neutrófilos e macrófagos obtidos de animais deficientes de ANXA1;
9) Induz *downregulation* na secreção de mediadores inflamatórios durante o processo de fagocitose de neutrófilos apoptóticos; efeito também dependente de ANXA1;
10) Não aumenta a expressão de CD36.

11) Aumenta a expressão proteica de PPARγ, sem aumentar a expressão de ANXA1.

Em conjunto, os dados obtidos mostram que a LYSO-7 é agente pró-resolutivo na úlcera gástrica crônica, e os mecanismos envolvidos podem estar associados à sua atividade sobre a indução da apoptose de neutrófilos e da fagocitose dos mesmos por macrófagos. Este último efeito foi abolido em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$, uma vez que a expressão de PPARγ nestas células está reduzida, mostrando, assim, o controle da ANXA1 na expressão deste receptor.

REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, M.M.; O'RIORDAN, J.; WINDLE, H.J.; CARTON, E.; RAVI, N.; KELLEHER, D.; REYNOLDS, J.V. NF-kappaB activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy. **Ann. Surg.,** v. 239, p. 491-500, 2004.

ABRAHAM, N.S. Proton pump inhibitors: potential adverse effects. **Curr. Opin. Gastroenterol**., v. 28, p. 615-620, 2012.

AHMADIAN, M.; SUH, J.M.; HAH, N.; LIDDLE, C.; ATKINS, A.R.; DOWNES, M.; EVANS, R.M. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat. Med**., v. 19, p. 557-566, 2013.

ALESHIN, S.; REISER, G. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)-α, β/δ and γ triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain. **Biol. Chem**. 2013.

ALESSANDRI, A.L.; SOUSA, L.P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol. Ther.**, v. 139, p. 189-212, 2013.

AMATO, A.A.; NEVES, F.A. Idealized PPARgamma-Based Therapies: Lessons from Bench and Bedside. PPAR Res. 2012, 978687, 2012.

AMATO, A.A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J.Z.; CARVALHO, B.M.; FIGUEIRA, A.C.; LU, J.; AYERS, D.; MOTTIN, M.; SILVEIRA, R.L.; SOUZA, P.C.; MOURÃO, R.H.; SAAD, M.J.; TOGASHI, M.; SIMEONI, L.A.; ABDALLA, D.S.; SKAF, M.S.; POLIKPARPOV, I.; LIMA, M.C.; GALDINO, S.L.; BRENNAN, R.G.; BAXTER, J.D.; PITTA, I.R.; WEBB, P.; PHILLIPS, K.J.; NEVES, F.A. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor c (PPARc) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **J. Biol. Chem**. v. 287, p. 28169-28179, 2012.

APRAHAMIAN, T.; BONEGIO, R.G.; RICHEZ, C.; YASUDA, K.; CHIANG, L.K.; SATO, K.; WALSH, K.; RIFKIN, I.R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone ameliorates murine lupus by induction of adiponectin. **J. Immunol.**, v. 182, p. 340-346, 2009.

ARAÚJO, C.V.; ESTATO, V.; TIBIRIÇÁ, E.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; SILVA, A.R. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. **Microvasc. Res**., v. 84, p. 218-221, 2012.

ARUR, S.; UCHE, U.E.; REZAUL, K.; FONG, M.; SCRANTON, V.; COWAN, A.E.; MOHLER, W.; HAN, D.K. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev. Cell**., v. 4, p. 587-598, 2003.

ASADA, K.; SASAKI S.; SUDA, T.; CHIDA, K.; NAKAMURA, H. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages. **Am. J. Respir Crit. Care Med.**, v. 169, p. 195-200, 2004.

BALAKUMAR, P.; ROSE, M.; GANTI, S.S.; KRISHAN, P.; SINGH, M. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? **Pharmacol. Res**., v. 56, p. 91-98, 2007.

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic review of the symptom burden, quality of life impairment and costs associated with peptic ulcer disease. **Am. J. Med.,** v. 123, p. 358–366, 2010.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Crit. care Med.**, v. 33, p. 498-501, 2005.

BERGER, J.; MOLLER D.E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 409–435, 2002.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**., v. 13, p. 584-590, 2006.

BERGER, J.P.; AKIYAMA, T.E.; MEINKE, P.T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. **Trends Pharmacol. Sci**., v. 26, p. 244–251, 2005.

BESERRA, A.M.; CALEGARI, P.I.; SOUZA, M. DO C.; DOS SANTOS, R.A.; LIMA, J.C.; SILVA, R.M.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. **J. Agric. Food Chem**., v. 59, p. 6957-6965, 2011.

BETZ, B.; SCHNEIDER, R.; KRESS, T.; SCHICK, M.A.; WANNER, C.; SAUVANT, C. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. **PPAR Res**., v. 2012, p. 2012:219319, 2012.

BISCETTI, F.; STRAFACE, G.; ZACCARDI, F.; GHIRLANDA, G.; FLEX, A. Peroxisome proliferator-activated receptors and angiogenesis. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 19, p. 751-759, 2009.

BISHOP-BAILEY, D.; BYSTROM, J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. **Pharmacol. Ther**., v. 124, p. 141-50, 2009.

BITZIOU, E.; PATEL, B.A. Simultaneous detection of gastric acid and histamine release to unravel the regulation of acid secretion from the guinea pig stomach. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,** v. 303, p. G396–G403, 2012.

BLATCHFORD, O.; DAVIDSON, L.A.; MURRAY, W.R.; BLATCHFORD, M.; PELL, J. Acute upper gastrointestinal haemorrhage in west of Scotland: case ascertainment study. **BMJ,** v. 315, p. 510–514, 1997.

BLUME, K.E.; SOEROES, S.; KEPPELER, H.; STEVANOVIC, S.; KRETSCHMER, D.; RAUTENBERG, M.; WESSELBORG, S.; LAUBER, K. Cleavage of annexin A1 by

ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic ‘‘find-me’’ signal. **J. Immunol.**, v. 188, p. 135-145, 2012.

BOURNAZOU, I.; POUND, J.D.; DUFFIN, R.; BOURNAZOS, S.; MELVILLE, L.A.; BROWN, S.B.; ROSSI, A.G.; GREGORY, C.D. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 20-32, 2009.

BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; DAUCA, M.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v. 137, p. 354-66, 1996.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment--Polish achievements. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.3, p. 99-126, 2003.

BRZOZOWSKI, Y.; KONTUREK, P.C.; PAIDO, R.; KWIECIEN, S.N.; KONTUREK, S.; TARGOSZ, A.; BURNAT, G.; CIESZKOWSKI, J.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma): a new compound with potent gastroprotective and ulcer healing properties. Inflammopharmacology, v. 13, p. 317-330, 2005.

CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPARγ agonists: time for a reassessment. **Trends Endocrinol Metab**., v. 23, p. 205-215, 2012.

CELINSKI, K.; DWORZANSKI, T.; KOROLCZUK, A.; PIASECKI, R.; SLOMKA, M.; MADRO, A.; FORNAL, R. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 62, p. 347-356, 2011.

CHANDEL, N.S.L; BUDINGER, G.R.S. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Free Rad. Biol. Med.**, v.42 p. 165–174, 2007

CHANG, F.; JABER, L.A.; BERLIE, H.D.; O'CONNELL, M.B. Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. **Ann. Pharmacother**., v. 41, p. 973-983, 2007.

CHOI, J.H.; BANKS, A.S.; ESTALL, J.L.; KAJIMURA, S.; BOSTRÖM, P.; LAZNIK, D.; RUAS, J.L.; CHALMERS, M.J.; KAMENECKA, T.M.; BLÜHER, M.; GRIFFIN, P.R.; SPIEGELMAN, B.M. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. **Nature**, v. 466, p. 451–456, 2010.

CHOI, J.H.; BANKS, A.S.; KAMENECKA, T.M.; BUSBY, S.A.; CHALMERS, M.J.; KUMAR, N.; KURUVILLA, D.S.; SHIN, Y.; HE, Y.; BRUNING, J.B.; MARCIANO, D.P.; CAMERON, M.D.; LAZNIK, D.; JURCZAK, M.J.; SCHÜRER, S.C.; VIDOVIC, D.; SHULMAN, G.I.; SPIEGELMAN, B.M.; GRIFFIN, P.R. Antidiabetic actions of a

non-agonist PPARc ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. **Nature**, v. 477, p. 477–481, 2011.

CHU, S.; SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol**., v. 29, p.636-641, 2013.

COCK, T.A.; HOUTEN, S.M.; AUWERX, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-c: too much of a good thing causes harm. **EMBO Rep**., v. 5, p. 142–147, 2004.

COCKBURN, A.N.; MORGAN, C.J.; GENTA, R.M. Neuroendocrine proliferations of the stomach: a pragmatic approach for the perplexed pathologist. **Adv. Anat. Pathol.,** v. 20, p.148–157, 2013.

COLLINO, M.; PATEL, N.S.A.; THIEMERMANN, C. PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. **Ther. Adv. Cardiovasc. Dis**., v.3, p. 179-197, 2008.

COORAY, S.N.; GOBBETTI, T.; MONTERO-MELENDEZ, T.; MCARTHUR, S.; THOMPSON, D.; CLARK, A.J.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2013..

CRAWFORD, J. M. O trato gastrintestinal, estômago. In: ROBBINS, S.L. et al. Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.

DALLI, J.; JONES, C.P.; CAVALCANTI, D.M.; FARSKY, S.H.; PERRETTI, M.; RANKIN, S.M. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. **FASEB J.,** v. 26, p. 387-396, 2012.

DEEPINDER, F.; BRAUNSTEIN, G.D. Drug-induced gynecomastia: an evidence-based review. **Expert. Opin. Drug. Saf.**, v. 11, p. 779-795, 2012.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. **Mol. Endocrinol**., v. 18, p. 1321–1332, 2004.

DEVCHAND, P.R.; KELLER, H.; PETERS, J.M.; VAZQUEZ, M.; GONZALEZ, F.J.; WAHLI, W. The PPARalpha-Leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, v. 384, p. 39–43, 1996.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal Mucosal Defense. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 22, p.599–606, 2006.

DREIJERINK, K.M.; VARIER, R.A.; VAN BEEKUM, O.; JENINGA, E.H.; HÖPPENER, J.W.; LIPS, C.J.; KUMMER, J.A.; KALKHOVEN, E.; TIMMERS, H.T. The multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent adipocyte differentiation. **Mol. Cell. Biol**., v. 29, p. 5060-5069, 2009.

DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLI, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**., v. 68, p. 879-87, 1992.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DVORAK, K.; CHAVARRIA, M.; PAYNE, C.M.; RAMSEY, L.; CROWLEY-WEBER, C.; DVORAKOVA, B.; DVORAK, B.; BERNSTEIN, H.; HOLUBEC, H.; SAMPLINER, R.E.; BERNSTEIN, C.; PRASAD, A.; GREEN, S..B.; GAREWAL, H. Activation of the interleukin-6/STAT3 antiapoptotic pathway in esophageal cells by bile acids and low pH: relevance to barrett's esophagus. **Clin. Cancer Res**., v. 13, p. 5305-5313, 2007.

EHLIN, A.G.; MONTGOMERY, S.M.; EKBOM, A.; POUNDER, R.E.; WAKEFIELD, A.J. Prevalence of gastrointestinal diseases in two British national birth cohorts. **Gut**., v. 52, p. 1117-21, 2003.

EL-DEMERDASH, E.; EL-MESALLAMY, H.O.; ABU-ZAID, N.M.; GAD, M.Z. The potential therapeutic effect of nitric oxide modulators in experimentallyinduced gastric ulcers. **Drugs Discov. Ther.**, v. 4, p. 276-284, 2010.

ELLIOTT, M.R.; CHEKENI, F.B.; TRAMPONT, P.C.; LAZAROWSKI, E.R.; KADL, A.; WALK, S.F.; PARK, D.; WOODSON, R.I.; OSTANKOVICH, M.; SHARMA, P.; LYSIAK, J.J.; HARDEN, T.K.; LEITINGER, N.; RAVICHANDRAN, K.S. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**., v. 461, p. 282-286, 2009.

ENCICLOPÉDIA MULTIMÍDIA DO CORPO HUMANO. São Paulo: **Planeta De Agostini**, v. 4, 2000.

EVANS, R.M.; BARISH, G.D.; WANG, Y.X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat. Med.** v. 10, p. 355–361, 2004.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 890-898, 1998.

FARNESI-DE-ASSUNÇÃO, T.S.; ALVES, C.F.; CARREGARO, V.; DE OLIVEIRA, J.R.; DA SILVA, C.A.; CHERAIM, A.B.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. PPAR-γ agonists, mainly 15d-PGJ(2), reduce eosinophil recruitment following allergen challenge. **Cell. Immunol.**, v. 273, p. 23-29, 2012.

FERRER-FERRER, M.; MALESPÍN-BENDAÑA, W.; RAMÍREZ, V.; GONZÁLEZ, M.I.; CARVAJAL, A.; UNE, C. Polymorphisms in genes coding for hsp-70 are associated with gastric cancer and duodenal ulcer in a population at high risk of gastric cancer in costa rica. **Arch. Med. Res**., v. 44, p. 467-474, 2013.

FORMAN, B.M.; CHEN, J.; EVANS, R.M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4312-4317, 1997.

FREDENRICH, A.; GRIMALDI, P.A. PPAR delta: an uncompletely known nuclear receptor. **Diabetes Metab**., v. 31, p. 23−27, 2005.

FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; DURIEZ, P. The role of fibric acids in atherosclerosis. **Curr. Atheroscler. Rep**., v. 3, p.83–92, 2001.

GARDAI, S.J.; BRATTON, D.L.; OGDEN, C.A.; HENSON, P.M. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. **J. Leukoc. Biol**., v. 79, p. 896-903, 2006.

GIRI, S.; RATTAN, R.; SINGH, A.K.; SINGH, I. The 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits the inflammatory response in primary rat astrocytes via down-regulating multiple steps in phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-NF-kappaB-p300 pathway independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J. Immunol**., v.173, p. 5196-208, 2004.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol**., v. 55, p. 662-675, 1994.

GREEN, C.E.; PEARSON, D.N.; CAMPHAUSEN, R.T.; STAUNTON, D.E.; SIMON, S.I. Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity beta2-integrin on neutrophils. **J. Immunol.**, v. 172, p. 7780–7790, 2004.

GREEN, C.E.; PEARSON, D.N.; CHRISTENSEN, N.B.; SIMON, S.I. Topographic requirements and dynamics of signaling via L-selectin on neutrophils. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 284, p. C705–C717. 2003.

GREGORY, C.D.; POUND, J.D. Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and in vitro. **Apoptosis**, v.15, p. 1029-1049, 2010.

GUDE, D.R.; ALVAREZ, S.E.; PAUGH, S.W.; MITRA, P.; YU, J.; GRIFFITHS, R.; BARBOUR, S.E.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a ‘‘come-and-get-me’’ signal. **FASEB J**., v. 22, p. 2629-2638, 2008.

GUHA, P.; DEY, A.; CHATTERJEE, A.; CHATTOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.K. Pro-ulcer effects of resveratrol in mice with indomethacininduced gastric ulcers are reversed by L-arginine. **Br. J. Pharmacol**., v. 159, p. 726-734, 2010.

GUO, J.S.; CHO, C.H.; WANG, J.Y.; KOO, M.W. Differential effects of selective and non-selective inhibition of nitric oxide synthase on the expression and activity of cyclooxygenase-2 during gastric ulcer healing. **Eur. J. Pharmacol**., v. 536, p. 301-308, 2006.

HAM, M.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal defense. **Curr. Opin. Gastroenterol**., v. 23, p. 607-616, 2007.

HAWKEY, C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology,** v. 119, p. 521-35, 2000.

HEIN, H.O.; SUADICANI, P.; GYNTELBERG, F. Genetic markers for peptic ulcer. A study of 3387 men aged 54 to 74 years: the Copenhagen Male Study. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 32, p.16-21, 1997.

HILTON, D.; IMAN, N.; BURKE, G.J.; MOORE, A.; O'MARA, G.; SIGNORINI, D.; LYONS, D.; BANERJEE, A.K.; CLINCH, D. Absence of abdominal pain in older persons with endoscopic ulcers: a prospective study. **Am. J. Gastroenterol.,** v. 96, p. 380–384, 2001.

IHLE, N.T.; LEMOS, R.; SCHWARTZ, D.; OH, J.; HALTER, R.J.; WIPF, P.; KIRKPATRICK, L.; POWIS, G. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone prevents the hyperglycemia caused by phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibition by PX-866 without affecting antitumor activity. **Mol. Cancer. Ther.**, v. 8, p. 94-100, 2009.

HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; IVEY, K.J.; TERANO, A. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 289, p. 103-109, 1999.

HIRUMA-LIMA, C.A.; BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.A.; MAGRI, L.P.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from Virola surinamensis Warb. (Myristicaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 122, p. 406–409, 2009.

HOLT, K.M.; HOLLANDER, D. Acute gastric mucosal injury: pathogenesis and therapy. **Annu. Rev. Med.,** v. 37, p.107–124, 1986.
IALENTI, A.; GRASSIA, G.; DI MEGLIO, P.; MAFFIA, P.; DI ROSA, M.; IANARO, A. Mechanism of the anti-inflammatory effect of thiazolidinediones: relationship with the glucocorticoid pathway. **Mol. Pharmacol.**, v.67, p. 1620–1628, 2005.

IMAMOTO, E.; YOSHIDA, N.; UCHIYAMA, K.; KURODA, M.; KOKURA, S.; ICHIKAWA, H.; NAITO, Y.; TANIGAWA, T.; YOSHIKAWA, T. Inhibitory effect of pioglitazone on expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. **Biofactors**., v. 20, p. 37-47, 2004.

ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, p. 645-50, 1990.

JONES, A.; FUJIYAMA, C.; HAGUE, S.; BICKNELL, R. Assessment of angiogenic factors the chick chorioallantoic membrane assay. **Methods Mol. Med**., v. 58, p. 119-124, 2001.

KALAITZIDIS, R.G.; SARAFIDIS, P.A.; BAKRIS, G.L. Effects of thiazolidinediones beyond glycaemic control. Curr. **Pharm. Design**, v. 15, p. 529-536, 2009.

KRZNARIC, Z.; LJUBAS KELECIC, D.; RUSTEMOVIC, N.; VRANESIC BENDER, D.; OSTOJIC, R.; MARKOS, P.; SCARPIGNATO, C. Pharmaceutical principles of acid inhibitors: unmetneeds. **Dig. Dis.**, v. 29, p. 469-475, 2011.

KATO, S.; OHKAWA, F.; ITO, Y.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Role of endothelial nitric oxide synthase in aggravation of indomethacininduced gastric damage in adjuvant arthritic rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p. 147-155, 2009.

KAUNITZ, J.D.; AKIBA, Y. Review article: duodenal bicarbonate – mucosal protection, luminal chemosensing and acid-base balance. **Aliment. Pharmacol. Ther**., v. 4, p. 169-76, 2006.

KAWAI, M.; ROSEN, C.J. PPARγ: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. **Nat Rev Endocrinol.,** v. 6, p. 629-36, 2010.

KELLER, H.; DREYER, C.; MEDIN, J.; MAHFOUDI, A.; OZATO, K.; WAHLI, W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 2160– 2164, 1993.

KHAZAEI, M.; SALEHI, E.; RASHIDI, B. Pan-PPAR Agonist, Bezafibrate, Restores Angiogenesis in Hindlimb Ischemia in Normal and Diabetic Rats. **Int. J. Pept.**, v. 2012 p. 2012:637212, 2012.

KNIGHTON, D.R.; HUNT, T.K.; SCHEUENSTUHL, H.; HALLIDAY, B.J.; WERB, Z.; BANDA, M.J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science**, v. 221: p. 1283-1285, 1983.

KNOUFF, C.; AUWERX, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. **Endocr. Rev.**, v. 25, p.899–918, 2002.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 13, p. 159-175, 2013.

KOTA, B.P.; HUANG, T.H.; ROUFOGALIS, B.D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol. Res**., v. 51, p. 85-94, 2005.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res**., v. 455, p.155-166, 2000.

KUBECOVA, M.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; KACPRZAK, G.; BOBEK, V. Cimetidine: an anticancer drug? **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 18, p.439–444, 2011.

LAGNIER, D.; LAVERGNE, R.A.; MEUNIER, E.; LEFÈVRE, L.; DARDENNE, C.; AUBOUY, A.; BENOIT-VICAL, F.; RYFFEL, B.; COSTE, A.; BERRY, A.; PIPY, B. Nrf2, a PPARγ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. **PLoS Pathog**., v. 7, p.(9):e1002254, 2011.

LAHIRI, S.; SEN, T.; PALIT, G. Involvement of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator activated receptor-γ in pioglitazone mediated chronic gastric ulcer healing in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 609, p. 118-125, 2009.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAUBER, K.; BOHN, E.; KRÖBER, S.M.; XIAO, Y.J.; BLUMENTHAL, S.G.; LINDEMANN, R.K.; MARINI, P.; WIEDIG, C.; ZOBYWALSKI, A.; BAKSH, S.; XU, Y.; AUTENRIETH, I.B.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BELKA, C.; STUHLER, G.; WESSELBORG, S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell**, v. 113, p. 717-730, 2003.

LAUDET, V.; HÄNNI, C.; COLL, J.; CATZEFLIS, F.; STÉHELIN, D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO J**., v. 11, p.1003-1013, 1992.

LEE, K.; YEO, M.; CHOUE, J.; JIN, J.; PARK, S.J.; CHEONG, J.; LEE, K.J.; KIM, J.; HAHM, K. Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against Helicobacter pylori-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. 2730 **Helicobacter**, v. 9, p. 632–642, 2004.

LEE, H.N.; SURH, Y.J. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. **Biochem. Pharmacol**., v. 84, p. 1340-1350, 2012.

LI, C.Y.; XU, H.D.; ZHAO, B.T.; CHANG, H.I.; RHEE, H.I. Gastroprotective effect of cyaniding 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. **Alcohol**, v. 42, p. 683-687, 2008.

LI, J.; LI, P.; ZHANG, Y.; LI, G.B.; HE, F.T.; ZHOU, Y.G.; YANG, K.; DAI, S.S. Upregulation of ski in fibroblast is implicated in the peroxisome proliferator—activated receptor δ-mediated wound healing. **Cell. Physiol. Biochem**., v. 30, p.1059-71, 2012.

LIANG, Y.J.; JIAN, J.H.; LIU, Y.C.; JUANG, S.J.; SHYU, K.G.; LAI, L.P.; WANG, B.W.; LEU, J.G. Advanced glycation end products-induced apoptosis attenuated by PPARdelta activation and epigallocatechin gallate through NF-kappaB pathway in human embryonic kidney cells and human mesangial cells. **Diabetes Metab. Res. Rev**., v. 26, p. 406-416, 2010.

LINCOFF, A.M.; TARDIF, J.C.; NEAL, B.; NICHOLLS, S.J.; RYDÉN, L.; SCHWARTZ, G.G.; MALMBERG, K.; BUSE, J.B.; HENRY, R.R.; WEDEL, H.; WEICHERT, A.; CANNATA, R.; GROBBEE, D.E. Evaluation of the dual peroxisome proliferator-activated receptor α/γ agonist aleglitazar to reduce cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome and type 2 diabetes mellitus: Rationale and design of the AleCardio trial. **Am. Heart J.,** v. 166, p. 429-434, 2013.

LIM, H.A.; LEE, E.K.; KIM, J.M.; PARK, M.H.; KIM, D.H.; CHOI, Y.J.; HA, Y.M.; YOON, J.H.; CHOI, J.S.; YU, B.P.; CHUNG, H.Y. PPARγ activation by baicalin

suppresses NF-κB-mediated inflammation in aged rat kidney. **Biogerontology**., v. 13, p. 133-145, 2012.

LIPOF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R.A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World J. Gastroenterol**., v. 12, p. 3248-3252, 2006.

LONG, E.M.; KLIMOWICZ, A.C.; PAULA-NETO, H.A.; MILLEN, B.; MCCAFFERTY, D.M.; KUBES, P.; ROBBINS, S.M. A subclass of acylated anti-inflammatory mediators usurp Toll-like receptor 2 to inhibit neutrophil recruitment through peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 108, p. 16357-16362, 2011.

LU, C.L.; CHANG, S.S.; WANG, S.S.; CHANG, F.Y.; LEE, S.D. Silent peptic ulcer disease: frequency, factors leading to ‘‘silence,’’ and implications regarding the pathogenesis of visceral symptoms. **Gastrointest. Endosc**., v. 60, p. 34–38, 2004.

MA, L.; WALLACE, J.L. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 279, p. G341-G346, 2000.

MAHADEVA, S.; GOH, K.L. Epidemiology of functional dyspepsia: a global perspective. **World J. Gastroenterol**., v. 12, p. 2661-2666, 2006.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.; MCCOLL, K.E. Peptic ulcer disease. **Lancet,** v. 374, p. 1449-1461, 2009.

MALFERTHEINER, P.; LEODOLTER, A.; PEITZ, U. Cure of Helicobacter pyloriassociated ulcer disease through eradication. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 14, p. 119–132, 2000.

MARLOW, G.J.; VAN GENT, D.; FERGUSON, L.R. Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. **World J. Gastroenterol.,** v. 19, p. 3931-3941, 2013.

MARROTTA, F.; TAJIRI, H.; SAFRAN, P.; FESCE, E.; IDEO, G. Ethanol related gastric mucosal damage: evidence of a free radical mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. **Digestion,** v. 60, p. 538–543, 1999.

MARTIN, H.L.; MOUNSEY, R.B.; MUSTAFA, S.; SATHE, K.; TEISMANN, P. Pharmacological manipulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) reveals a role for anti-oxidant protection in a model of Parkinson’s disease. **Exp. Neurol.**, v. 235, p. 528-538, 2012.

MASSIGNANI, J.J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; SCHAPHAUSER, H.P.; JORGE, R.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of Baccharis dracunculifolia on different experimental models in rats. **Phytoter. Res**., v. 23, p. 1355–1360, 2009.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C.; SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res**., v. 239, p. 29-80, 1990.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S.L.; YETUKURI, L.; SHIMOMURA, K.; VIRTUE, S.; CAMPBELL, M.; CURTIS, R.K.; JIMENEZ-LINAN, M.; BLOUNT, M.; YEO, G.S.; LOPEZ, M.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; ASHCROFT, F.M.; ORESIC, M.; VIDAL-PUIG, A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. **PLoS Genet**., v. 3, p. (4):e64, 2007.

MERCHANT, J.L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **J. Clin. Invest.,** v.117, p. 6–12, 2007.

MEYER, S.; VOGT, T.; LANDTHALER, M.; BERAND, A.; REICHLE, A.; BATAILLE, F.; MARX, A.H.; MENZ, A.; HARTMANN, A.; KUNZ-SCHUGHART, L.A.; WILD, P.J. Cyclooxygenase 2 (COX2) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) Are Stage-Dependent Prognostic Markers of Malignant Melanoma. **PPAR Res**. 2009: 848645, 2009.

MICHALIK, L.; WAHLI, W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 598-606, 2006.

MORSY, M.; ASHOUR, O.; AMIN, E.; ROFAEIL, R. Gastroprotective effects of telmisartan on experimentally-induced gastric ulcers in rats. **Pharmazie**, v. 64, p. 590-594, 2009.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jpn. J. Pharmacol**., v. 33, p. 939-945, 1983.

MUKUNDAN, L.; ODEGAARD, J.I.; MOREL, C.R.; HEREDIA, J.E.; MWANGI, J.W.; RICARDO-GONZALEZ, R.R.; GOH, Y.P.; EAGLE, A.R.; DUNN, S.E.; AWAKUNI, J.U.; NGUYEN, K.D.; STEINMAN, L.; MICHIE, S.A.; CHAWLA, A. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. **Nat. Med**., v. 15, p. 1266-1272, 2009.

NAGANO, Y.; MATSUI, H.; TAMURA, M.; SHIMOKAWA, O.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; HYODO, I. NSAIDs and acidic environment induce gastric mucosal cellular mitochondrial dysfunction. **Digestion**., v. 85, p. 131-135, 2012.

NAIK, Y.; JAYARAM, S.; NAYAKA, M.A.H.; LAKSHMAN, DHARMESH, S.M. Gastroprotective effect of swallow root (Decalepis hamiltonii) extract: possible involvement of H(+)-K(+)-ATPase inhibition and antioxidative mechanism. **J. Ethnopharmacol**., 112:173–179, 2007.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory diseases. **Nihon. Rinsho**., v. 68, p. 341-349, 2010.

NAJM, W.I. Peptic ulcer disease. **Prim. Care Clin. Office Pract.,** v. 38, p. 383–394, 2011.

NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, T.; TARUI, T.; INOUE, J.; KINOSHITA, S. Functional role of PPARδ in corneal epithelial wound healing. **Am. J. Pathol.**, v. 180, p. 583-598, 2012.

NAPIMOGA, M.H.; VIEIRA, S.M.; DAL-SECCO, D.; FREITAS, A.; SOUTO, F.O.; MESTRINER, F.L.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; KAWAI, T.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. **J. Immunol.**, v.180, p. 609-617, 2008.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, p. 871-882, 2010.
NG, T.H.; BRITTON, G.J.; HILL, E.V.; VERHAGEN, J.; BURTON, B.R.; WRAITH, D.C. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Front. Immunol**., v. 4, p.129, 2013.

NIE, M.; CORBETT, L.; KNOX, A.J.; PANG, L. Differential regulation of chemokine expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: interactions with glucocorticoids and beta2-agonists. **J. Biol. Chem**., v. 280, p. 2550–2561, 2005.

OCK, C.Y.; KIM, E.H.; CHOI, D.J.; LEE, H.J.; HAHM, K.B.; CHUNG, M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. **World J. Gastroenterol**., v. 18, p. 302-308, 2012.

OHNO, N.; TERADA, N.; BAI, Y.; SAITOH, S.; NAKAZAWA, T.; NAKAMURA, N.; NAITO, I.; FUJII, Y.; KATOH, R.; OHNO, S. Application of cryobiopsy to morphological and immunohistochemical analyses of xenografted human lung cancer tissues and functional blood vessels. **Cancer**, v.113, p. 1068-1079, 2008.

OLAGNIER, D.; LAVERGNE, R.A.; MEUNIER, E.; LEFÈVRE, L.; DARDENNE, C.; AUBOUY, A.; BENOIT-VICAL, F.; RYFFEL, B.; COSTE, A.; BERRY, A.; PIPY, B. Nrf2, a PPARγ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. **PLoS Pathog**., v.7, p. e1002254, 2011.

OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. **Nat. Rev. Drug. Discov.,** v.2, p. 132-139, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. **Organisation for Economic Cooperation and Development**, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. **Organisation for Economic Cooperation and Development**, Paris, 1995.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Mol. Med.** v. 5, p. 661-674, 2013.

OSHINO, N.; CHANCE, B.; SIES, H.; BUCHER, T. The role of H2O2 generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. **Arch. Biochem. Biophys**., v. 154, p.117–131, 1973.

OVERMIER, J.B.; MURISON, R. Restoring psychology's role in peptic ulcer. **Appl. Psychol. Health Well Being**., v. 5, p. 5-27, 2013.

PANCIONE, M.; FORTE, N.; SABATINO, L.; TOMASELLI, E.; PARENTE, D.; FEBBRARO, A.; COLANTUONI, V. Reduced beta-catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor-associated macrophages, cyclooxygenase 2, and patient outcome. **Hum. Pathol.**, v. 40, p. 714-25, 2009.

PATERNITI, I.; MAZZON, E.; RICCARDI, L.; GALUPPO, M.; IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CAPPELLANI, A.; CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice. **Surgery**, v. 152, p. 90-106, 2012.

PATHAK, R.; ASAD, M.; HRISHIKESHAVAN, H.J.; PRASAD, S. Effect of peroxisome proliferator-actived receptor-alpha agonist (bezafibrate) on gastric secretion and gastric cytoprotection in rats. Fund. Clin. Pharmacol., v. 21, p. 291-296, 2007.

PERINI, R.F.; MA, L.; WALLACE, J.L. Mucosal repair and COX-2 inhibition. **Curr. Pharm. Des**., v. 9, p. 2207-2211, 2003.

PERRETTI, M.; CROXTALL, J.D.; WHELLER, S.K.; GOULDING, N.J.; HANNON, R.; FLOWER, R.J. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. **Nat. Med.**, v. 2, p.1259-1262, 1996.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 62-70, 2009.

PERRETTI, M.; INGEGNOLI, F.; WHELLER, S.K.; BLADES, M.C.; SOLITO, E.; PITZALIS, C. Annexin 1 modulates monocyte-endothelial cell interaction in vitro and cell migration in vivo in the human SCID mouse transplantation model. **J. Immunol.**, v.169, p. 2085-2092, 2002.

PERRETTI, M.; SOLITO, E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 32, p. 507-510, 2004.

POMMIER, B.; MARIE-CLAIRE, C.; DA NASCIMENTO, S.; WANG, H. L.; ROQUES, B. P.; NOBLE, F. Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis. **J. Neurochem**., v. 85, p. 454-46, 2003.

PYPER, S.R.; VISWAKARMA, N.; YU, S.; REDDY, J.K. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. **Nucl. Recept. Signal**., v. 6, p.8:e002, 2010.

RAINSFORD, K.D.; WHITEHOUSE, M.W. Biochemical gastroprotection from acute ulceration induced by aspirin and related drugs. **Biochem. Pharmacol**., v. 29, p. 1281-1289, 1980.

RAMAKRISHMAN, K.; SALINAS, R.C. Peptic ulcer disease. **Am. Fam. Phys.,** v. 76, p.1005–1012, 2007.

RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 1197, p. 63-93, 1994.

RECCHIUTI, A. Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**., 2013.

REDDY, R.C.; NARALA, V.R.; KESHAMOUNI, V.G.; MILAM, J.E.; NEWSTEAD, M.W.; STANDIFORD, T.J. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma}. **Blood**., v. 112, p. 4250-4258, 2008.

REILLY, C.M.; OATES, J.C.; COOK, J.A.; MORROW, J.D.; HALUSHKA, P.V.; GILKESON, G.S. Inhibition of mesangial cell nitric oxide in MRL/lpr mice by prostaglandin J2 and proliferator activation receptor-gamma agonists. **J. Immunol**., v. 164, p.1498-1504, 2000.

RICHARD, C.L.; LOWTHERS, E.L.; BLAY, J. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) down-regulates CXCR4 on carcinoma cells through PPARgamma- and NFkappaB-mediated pathways. **Exp. Cell Res.**, v. 313, p. 3446-3458, 2007.

RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; KELLY, C.J.; GLASS, C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, p. 79-82, 1998.

RIZVI, Y.Q.; MEHTA, C.S.; OYEKAN, A. Interactions of PPAR-alpha and adenosinereceptors in hypoxia-induced angiogenesis. **Vascul. Pharmacol.**, 2013.

ROCHA, N.F.; OLIVEIRA, G.V.; ARAÚJO, F.Y.; RIOS, E.R.; CARVALHO, A.M.; VASCONCELOS, L.F.; MACÊDO, D.S.; SOARES, P.M.; SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C. (-)-α-Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **Eur. J. Pharm. Sci**., v. 44, p. 455-461, 2011.

ROCKALL, T.A.; LOGAN, R.F.; DEVLIN, H.B.; NORTHFI-ELD, T.C. Incidence of and mortality from acute upper gastrointestinal haemorrhage in the United Kingdom. Steering Committee and members of the National Audit of Acute Upper Gastrointestinal Haemorrhage. **BMJ**, v. 311, p. 222–226, 1995.

ROSENSON, R.S.; WRIGHT, R.S.; FARKOUH, M.; PLUTZKY, J. Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. **Am. Heart. J.**, v. 164, p. 672-680, 2012.

ROSZER, T.; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M.P.; LEFTEROVA, M.I.; ALAMEDA, D.; NÚÑEZ, V.; LAZAR, M.A.; FISCHER, T.; RICOTE, M. Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. **J. Immunol**., v. 186, p. 621-631, 2011.

RUKKUMANI, R.; ARUNA, K.; VARMA, P.S.; RAJASEKARAN, K.N.; MENON, V.P. Comparative effects of curcumin and an analog of curcumin on alcohol and PUFA induced oxidative stress. **J. Pharm. Pharm. Sci**., v. 7, p. 274-283, 2004.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; VAGIN, O.; LAMBRECHT, N.; YAKUBOV, I.; MUNSON, K. The gastric H, K ATPase as a drug target: past, present, and future. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 41, p. S226–S242, 2007.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; HUNT, R. Novel approaches to inhibition of gastric acid secretion. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 12, p. 437-447, 2010.

SADAGHIANI, M.S.; JAVADI-PAYDAR, M.; GHAREDAGHI, M.H.; FARD, Y.Y.; DEHPOUR, A.R. Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: the role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. **Behav. Brain Res.**, v. 24, p. 336-343, 2011.

SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; KLEIN-JÚNIOR, L.C.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimentalmodels. **J. Ethnopharmacol.**, v. 130, p. 334–339, 2010.

SANTIN, J.R.; UCHÔA, F.D.; LIMA, M.C.;, RABELLO, M.M.; MACHADO, I.D.; HERNANDES, M.Z.; AMATO, A.A.; MILTON, F.A.; WEBB, P.; NEVES, F. DE A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **Eur. J. Pharm. Sci**., v. 48, p. 689-697, 2013a.

SANTIN, J.R.; DAUFENBACK MACHADO, I.; RODRIGUES, S.F.; TEIXEIRA, S.; MUSCARÁ, M.N.; LINS GALDINO, S.; DA ROCHA PITTA, I.; FARSKY, S.H. Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions. **PLoS One**., v. 8, p. e76894, 2013b.

SARAF, N.; SHARMA, P.K.; MONDAL, S.C.; GARG, V.K.; SINGH, A.K. Role of PPARγ2 transcription factor in thiazolidinedione-induced insulin sensitization. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 64, p. 161–171. 2012.

SATO, T.; AMANO, H.; ITO, Y.; ESHIMA, K.; MINAMINO, T.; AE, T.; KATADA, C.; OHNO, T.; HOSONO, K.; SUZUKI, T.; SHIBUYA, M.; KOIZUMI, W.; MAJIMA, M.

Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the upregulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1(+)CXCR4 (+) cells recruited from bone marrow. **J. Gastroenterol.**, 2013.

SAAVEDRA, J.M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, p. 1-18, 2011.

SCANNELL, M.; FLANAGAN, M.B.; DESTEFANI, A.; WYNNE, K.J.; CAGNEY, G.; GODSON, C.; MADERNA, P. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. **J. Immunol**., v. 178, p. 4595-4605, 2007.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacol. Res.,** v.58, p. 165-171, 2008.

SCHLAEPFER, D.D.; HAIGLER, H.T.; Characterization of Ca2+-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. **J. Biol. Chem.,** v. 262, p.:6931-6937, 1987.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 1302, p. 93-109, 1996.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p.1842–1860, 2008.

SERHAN, C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol**., v.25, p.101-137, 2007.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol**., v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. Gastroenterology., v. 5, p. 43–61, 1945.

SHEEN, E.; TRIADAFILOPOULOS, G. Adverse effects of long-term proton pumpinhibitor therapy. **Dig. Dis. Sci.** v. 56, p. 931-950, 2011.

SOLITO, E.; CHRISTIAN, H.C.; FESTA, M.; MULLA, A.; TIERNEY, T.; FLOWER, R.J.; BUCKINGHAM, J.C. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J.** v. 20, p. 1498-500, 2006.

SOUZA, R.F.; SHEWMAKE, K.; TERADA, L.S.; SPECHLER, S.J. Acid exposure activates the mitogen-activated protein kinase pathways in Barrett’s esophagus. **Gastroenterology**, v. 122, p. 299–307, 2002.

SPENCER, N.F.; POYNTER, M.E.; IM, S.Y.; DAYNES, R.A. Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. **Int. Immunol.**, v.9, p. 1581–1588, 1997.

STAELS, B.; VU-DAC, N.; KOSYKH, V.A.; SALADIN, R.; FRUCHART, J.C.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for thehypolipidemic action of fibrates. **J. Clin. Invest.,** v. 95, p.705-712, 1995.

STRAUS, D.S.; PASCUAL, G.; LI, M.; WELCH, J.S.; RICOTE, M.; HSIANG, C.H.; SENGCHANTHALANGSY, L.L.; GHOSH, G.; GLASS, C.K. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 97, p. 4844-4899, 2000.

STRAUSS, D.S.; GLASS, C.K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 551–558, 2007.

SUN, S.B.; MATSUMOTO, T.; YAMANDA, H. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of Bupleurum folcatum L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 43, p. 699–704, 1991.

TAKAMURA, T.; ANDO, H.; NAGAI, Y.; YAMASHITA, H.; NOHARA, E.; KOBAYASHI, K. Pioglitazone prevents mice from multiple low-dose streptozotocin-induced insulitis and diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 44, p.107-114, 1999.

TAMURA, M.; MATSUI, H.; KANEKO, T.; HYODO, I. Alcohol is an oxidative stressor for gastric epithelial cells: detection of superoxide in living cells. **J. Clin. Biochem. Nutr**., v. 53, p. 75-80, 2013.

TARGOWNIK, L.E.; METGE, C.J.; LEUNG, S.; CHATEAU, D.G. The relative efficacies of gastroprotective strategies in chronic users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Gastroenterology**., v. 134, p. 937- 944, 2008.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jpn. J. Pharmacol**., v. 19, p. 418-426, 1969.

TAKAGI, T.; NAITO, Y.; ICHIKAWA, H.; TOMATSURI, N.; KATADA, K.; ISOZAKI, Y.; KURODA, M.; KOKURA, S.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. A PPAR-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2), inhibited gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Redox Rep.**, v. 9, p. 376-381, 2004.

TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; FISMAN, E.Z. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. **Cardiovasc. Diabetol**., v.16, p. 4:14, 2005.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARγ. **Annu. Rev. Biochem**., 77, 289–312 (2008).

TORRA, I.P.; CHINETTI, G.; DUVAL, C.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 12, p. 245-54, 2001.

TRUMAN, L.A.; FORD, C.A.; PASIKOWSKA, M.; POUND, J.D.; WILKINSON, S.J.; DUMITRIU, I.E.; MELVILLE, L.; MELROSE, L.A.; OGDEN, C.A.; NIBBS, R.; GRAHAM, G.; COMBADIERE, C.; GREGORY, C.D. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. **Blood**., v. 112, p. 5026-5036, 2008.

TSENG, C.H.; TSENG, F.H. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and bladder cancer: lessons from animal studies. **J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.**, v. 30, p. 368-402, 2012.

TULASSAY, Z.; HERSZENYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol**., v. 24, p. 99-108, 2010.

USTUN, O.; OZCELIK, B.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from 3274 *Cistus laurifolius* leaves. **J. Ethnopharmacol**., v. 108, p. 457–461, 2006.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, v. 544, p. 1-10, 1999.

VAN BEEKUM, O.; FLESKENS, V.; KALKHOVEN, E. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. **Obesity**, v. 17, p. 213-219, 2009.

VILLEGAS, I.; MARTÍN, A.R.; TOMA, W.; DE LA LASTRA, C.A. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 505, p. 195-203, 2004.

VONG, L.; D'ACQUISTO, F.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; LAVAGNO, L.; FLOWER, R.J.; WITKO-SARSAT, V.; PERRETTI, M. Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. **J. Biol. Chem**., v. 282, p. 29998-30004, 2007.

WAITES, C.R.; DOMINICK, M.A.; SANDERSON, T.P.; SCHILLING, B.E. Nonclinical safety evaluation of muraglitazar, a novel PPARalpha/gamma agonist. **Toxicol Sci**., v. 100, p. 248–258, 2007.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. S. Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WALLACE, J.L.; MCKNIGHT, G.W.; BELL, C.J. Adaptation of rat gastric mucosa to aspirin requires mucosal contact. **Am. J. Physiol**., v. 268, p. G134-G138, 1995.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WANG, A.C.; DAI, X.; LUU, B.; CONRAD, D.J. Peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 24, p. 688-693, 2001.

WANG, W.; LIN, Q.; LIN, R.; ZHANG, J.; REN, F.; ZHANG, J.; JI, M.; LI, Y. PPARα agonist fenofibrate attenuates TNF-α-induced CD40 expression in 3T3-L1 adipocytes via the SIRT1-dependent signaling pathway. **Exp. Cell. Res.**, v. 319, p. 1523-1533, 2013.

WEIN, S.; FAUROUX, M.; LAFFITTE, J.; DE NADAÏ, P.; GUAÏNI, C.; PONS, F.; COMÉRA, C. Mediation of annexin 1 secretion by a probenecid-sensitive ABC-transporter in rat inflamed mucosa. **Biochem. Pharmacol.**, v. 67, p. 1195-202, 2004.

WILCOX, C. M.; HIRSCHOWITZ, B.I. Treatment strategies for Zollinger-Ellison syndrome. **Expert Opin. Pharmacother.,** v. 10, p. 1145-1157, 2009.

XU, H.E.; LAMBERT, M.H.; MONTANA, V.G.; PARKS, D.J.; BLANCHARD, S.G.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; LEHMANN, J.M.; WISELY, G.B.; WILLSON, T.M.; KLIEWER, S.A.; MILBURN, M.V. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Mol. Cell**., v. 3, p. 397-403, 1999.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflamm. Res**., v.55, p. 359–363, 2006.

YU, K.; BAVONA, W.; KALLEN, C.B.; HARDING, H.P.; RAVERA, C.P.; Mc MAHON, G.; BROWN, M.; LAZAR, M.A Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. **J. Biol. Chem.**, v. 41, p.23975-23983, 1995.

YUEN, C.Y.; WONG, W.T.; TIAN, X.Y.; WONG, S.L.; LAU, C.W.; YU, J.; TOMLINSON, B.; YAO, X.; HUANG, Y. Telmisartan inhibits vasoconstriction via PPARγ-dependent expression and activation of endothelial nitric oxide synthase. **Cardiovasc. Res.**, v. 90, p. 122-129, 2011.

ZHAO, C.M.; CHEN, D. The ECL cell: relay station for gastric integrity. **Curr. Medicinal Chem.,** v. 19, p. 98–108, 2012.

ANEXOS

A) Artigo em fase final de experimentação e redação: PPAR pan-agonist controls GPCR-induced neutrophil adhesion and migration by acting on PPARγ.

PPAR pan-agonist controls GPCR-induced neutrophil adhesion and migration by acting on PPARγ

JOSÉ ROBERTO SANTIN,[1] ISABEL DAUFENBACK MACHADO,[1] CARINE CRISTIANE DREWES,[1] RODRIGO SOARES MARCONDES,[1] DANIELLE MAIA CAVALCANTI,[1] IVAN DA ROCHA PITTA,[2] SANDRA HELENA POLISELLI FARSKY[1]

[1]Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

[2]Department of Chemistry, Federal University of Pernambuco, Pernabumbuco, Recife, Brazil.

Corresponding author:

Dra. Sandra HP Farsky, Department of Clinical and Toxicological Analyses

School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

Av. Professor Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, São Paulo, Brazil

CEP: 05508-900 - Tel.: +55 11 3091 1193

E-mail address: sfarsky@usp.br

ABSTRACT:

We have previously shown that LYSO-7, a PPAR pan agonist, present *in vivo* high anti-inflammatory activity, which is related to impaired neutrophil influx into inflamed cavities. Although it has been shown that PPAR agonists inhibit neutrophil functions, the molecular mechanisms of actions are not elucidated. Here we investigated the profile of PPAR isoforms expressed by neutrophils and the actions of LYSO-7 on adhesive and locomotion activities evoked by G-protein coupled receptors (GPCR) activation. Leukocyte-endothelial interactions were quantified by intravital microscopy. Protein expression PPAR (western blot) and gene expression (RT-PCR) of CD62L and CD18, neutrophil adhesion to primary culture of microvascular endothelial cell (PMEC), neutrophil chemotaxis (multiwell chamber), intracellular calcium levels (flow cytometer) and translocation of NF-κB were *in vitro* evaluated on neutrophils obtained from peritoneal cavity of male Wistar rats. LYSO-7 or formyl-methionyl-leucil-phenylalanine (fMLP) treatments enhanced neutrophil expression PPARγ and β/δ, with marked increase on PPARγ expression. LYSO-7 pre-treatment into mesenteric postcapillary venules decreased fMLP-induced leukocyte-endothelial interactions. The direct action of LYSO-7 on neutrophils was observed by reduced neutrophil adhesion to LPS-activated PMEC. These effects may reflect a direct inhibitory action of LYSO-7 on NF-κB nuclear translocation, impairing gene and, consequently, membrane expression of CD62L and CD18 on neutrophils. Taken together, data here obtained show that PPAR agonists acts through PPARγ on neutrophils, by blocking adhesive and locomotory functions evoked by GPCR activation.

Keywords: intravital microscopy; CD62L; CD18; NF-κB; calcium.

INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are transcription factors of the nuclease hormone receptor superfamily, and their important role on the regulation on metabolism, inflammation and immune responses have been fully shown (Di Paola et al., 2011). Actually, three PPAR isoforms have been identified, PPARα, PPARβ/δ and PPARγ (Paterniti et al., 2012; Ahmadian et al., 2013), and a diversity of studies have highlighted that activation of all isoforms is involved in the control of inflammatory gene expression, and can negatively interfere with pro-inflammatory transcription factor signaling pathways in inflammatory cells (Bishop-Bailey and Bystrom, 2009). Although PPARs agonists have been fully clinically employed by the beneficial effects to glucose and lipids metabolism and immune system, their therapeutic efficacy has been discussed, especially to cause adverse effects on the cardiovascular system and induce gain weight. Therefore, PPAR pan-agonists have been proposed as a potential tool to amplify the therapeutic action and reduce the mainly adverse effects (Feldman et al., 2008; Zhang et al., 2012). In this context, we have shown that LYSO-7, the first indol-thiazolidiene PPAR pan agonist described, induces a potent *in vivo* anti-inflammatory activity and lesser adverse effects as compared to pioglitazone treatment, a PPARγ agonist (Santin et al., 2013a, 2013b). The LYSO-7 *in vivo* anti-inflammatory activity was observed in experimental models of acute inflammation, and a potent inhibition on neutrophil influx to inflamed cavities was detected, suggesting that neutrophil adhesion and locomotory properties could be a direct target of LYSO-7.

Neutrophils were used to be the relevant cell in the innate immune response; nonetheless their actions on interface of innate/adaptative immune responses, as well as their ability to display adaptative functions has been shown, which has enhanced the importance of neutrophils in the host defense (Ostanin et al., 2011;

Puga et al., 2011; Kolaczkowska and Kubes, 2013). Neutrophils are rapidly mobilized and are the first cells to arrive at the lesion site, where they phagocyte pathogens by killing different mechanisms, as they release granules of enzymes or by the generation of ROS (Li and Ng, 2012). Neutrophils express a wide range of membrane receptors, such as adhesion molecules and chemoattractant receptors, prompting them to react to exogenous stimuli and endogenous chemical mediators (Li and Ng, 2012). Neutrophil recruitment is a complex process and involves a cellular and molecular signaling. First, flowing neutrophils roll along the endothelium, dependent on the binding of CD62L, which is expressed by activated leukocytes, and interacts with constitutive carbohydrates, or even to CD62P or CD62E expressed on endothelial cells (Green et al., 2004, Chavaski, 2012). The following, firm adhesion to the endothelium is mediated by the expression and function of integrin family molecules, especially CD18, by interacting with a diversity of endothelial membrane components and immunoglobulin superfamily molecules, which is pivotal to the subsequent transmigration into the extravascular matrix (Serhan, 2007; Kolaczkowska and Kubes, 2013). In the tissue, neutrophils directly migrate to the lesion site, in response to chemotactic mediators generated by the activation of plasma protein or secreted by activated resident cells. However, uncontrolled inflammatory processes can lead tissue damage to the host, consequently the neutrophil migration into lesion site represents an important point of control, to limit the inflammatory process, and it may represent a therapeutic strategy (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Based on these evidences, it may be supposed that neutrophils are target of PPAR agonists, nevertheless, the molecular mechanisms involved, as well as the actions of a PPAR pan agonist has not been elucidated.

Therefore, here we show that PPARγ is the principal PPAR receptor expressed by neutrophils, and it is responsible for the modulatory effects of PPAR agonists on adhesion and locomotion activities induced by GPCR activation.

METHODS AND MATERIALS

Animals

Male Wistar rats (150–250 g) were provided by the Central Animal House of the School of Pharmaceutical Science and the Chemistry Institute of the University of São Paulo. The animals were housed in standard cages, at room temperature (25±3°C), with 12 h dark/12 h light cycles, and supplemented with food and water *ad libitum*. They were transferred to the laboratory 12 hours prior to the experiments and were given water *ad libitum*. All procedures were performed according to the Brazilian Society of Science of Laboratory Animals guidelines for the proper care and use of experimental animals.

Neutrophil isolation

Neutrophils were obtained from male Wistar rats 4 h after an intraperitoneal (i.p.) injection of 10 mL of 1% sterile oyster glycogen solution in phosphate-buffered saline (PBS). Following this period, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) and the cells were collected by rinsing the abdominal cavity with 10 mL of sterile PBS. The number of viable cells (98%) was counted in a Neubauer chamber using a light microscope (Nikkon, Japan)

Effects of LYSO-7 on PPAR protein expression

To evaluate the protein expression of PPARγ, α and δ in the neutrophils treated with LYSO-7 was employed the western blot assay. Briefly, neutrophil proteins were extracted in RIPA buffer (0.1% SDS, 1% Igepal CA-630, 1% sodium deoxycholate, 10 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) containing leupeptin (10 µg/mL), soybean trypsin inhibitor (10 µg/mL), aprotinin (2 µg/mL) and PMSF (1 mM).

Homogenized proteins (60 μg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE; 15%) and were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking non-specific sites with 1% casein, membranes were incubated overnight with primary rabbit polyclonal antibodies raised against PPARγ (Abcam, San Francisco, CA, USA, 1 μg/mL), PPARα (Abcam, San Francisco, CA, USA, 1 μg/mL) or PPARδ (Abcam, San Francisco, CA, USA, 2 μg/mL). Membranes were washed with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody. A chemiluminescent assay (HRP SuperSignalWestPico; Pierce, USA) was used to detect immunoreactive bands. The intensities of the bands were estimated by densitometry analysis and were compared to the intensity of β-actin expression.

Effect of LYSO-7 on leukocyte rolling and adhesion

To evaluate the endothelial interactions rats were anesthetized by i.p. injection of ketamine:xilazine (0.2 g/kg:0.02 g/kg) and the mesentery was surgically exteriorized. Animals were maintained on a special board thermostatically controlled at 37 °C, which included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was kept moist and warmed by irrigating the tissue with a warmed (37°C) Ringer-Locke solution (pH 7.2–7.4). The rate of solution outflow onto the exposed tissue was controlled to keep the preparation in continuous contact with a film of the solution. Transilluminated images were obtained by optical microscopy, captured with a video camera and simultaneously transmitted to a computer.

Interaction between leukocytes and vessel walls were analyzed by determining the number of rolling and adherent leukocytes on the postcapillary venule wall (20–30 μm diameter, 200 μm length) of the mesentery. Leukocytes moving in the periphery of the axial stream, in contact with the endothelium, were considered to be rollers and their number was determined in 5 min periods. The number of leukocytes adhered to the endothelium (stopped at the vessel wall) was determined in the same vascular segment at the end of 5 min. The number of rolling and adhered cells was quantified after topical application of vehicle or LYSO-7 (10 mM), in basal condition or after inducing a local inflammatory response by the topical application of 10 μl fMLP (10^{-7} μM). Three fields were evaluated per animal after application.

Effects of LYSO-7 on adhesion molecules protein and gene expression

In order to investigate the effects of LYSO-7 on protein expression of CD62L and CD18 the flow cytometry assay was employed. Neutrophils were incubated in the absence or presence of LYSO-7 and simultaneously stimulated or not with fMLP (10^{-7} μM, 1 h). Subsequently, cells were washed with cold PBS and incubated with monoclonal antibody anti-CD62L conjugated with PE or anti-CD18 conjugated with FITC at 4ºC during 20 min in the dark. Cells were analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA) and data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable neutrophils were considered for analysis. Results were expressed as mean of fluorescence intensity.

To gene expression of CD62L and CD18 total RNA was extracted from the neutrophils using Trizol reagent, according to manufacturer's instructions. RNA was quantified by absorbance at OD260. cDNA was synthesized from the total RNA (2 µg) via the use of an oligo(dT)15 primer (20 µg/ml) after incubation (70ºC, 5min) in the presence of a deoxynucleotide triphosphate mixture (dNTP, 2mM), ribonuclease inhibitor (20 U), and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (200 U) that had been dissolved in a reverse transcriptase buffer (25 µL final volume). The reverse transcription reaction occurred via incubation (42ºC, 60 min), and the obtained cDNA was incubated with Taq DNA Polymerase (2.5 U), 3'- and 5'-specific primers (0.4 µM), and a dNTP mix (200 µM) in a thermophilic DNA polymerase buffer that contained MgCl2 (1.5 mM).

Effects of LYSO-7 on adhesion *in vitro* assay

In vitro neutrophil adhesion assay was performed according to Stanimirovic et al. (1997) with some modifications, to investigate the effects of LYSO-7 on the ability of neutrophils to adhere on endothelial cell culture. Primary cultures of microvascular endothelial cells (PMECs) were obtained from the rat cremaster muscle using the method described by Chen et al. (1995) and modified by Lotufo et al. (2006). Rats were anesthetized and non-coagulated by intraperitoneal injection of heparin (1000 units per animal). The animals were exsanguinated by cutting the bilateral carotid arteries. Subsequently, the cremaster muscles were isolated, cut into pieces of approximately 2mm×2mm, and two pieces were placed into each well in a 24 well plate and cultured in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum and 1%

gentamicin. After 48 h, the tissues were discarded and the medium changed. When they achieved confluence, the cells were sub-cultured with trypsin–EDTA solution into a 96 well plate and after confluence the adherence assay was performed. The characterization of endothelial cell culture was performed by adding monoclonal antibody against PECAM-1. Briefly, confluent endothelial cells were stimulated with LPS (5 µg/mL) during 4 h (37ºC, 5% CO_2) to induce immunoglobulin superfamily adhesion molecules expressions. Afterwards, endothelial cells were washed with sterile HBSS and incubated with 2×10^5 neutrophils per well (30 min), which were previously treated with LYSO-7 (10 µM) (1 h; 37ºC) and stimulated or not with fMLP (10^{-7} µM). After the incubation period, endothelium and adhered neutrophils were washed and lysed with 100 µL of Triton X-100 (1% in HBSS) during 15 min (4ºC). Then, 100 µL of a solution containing equal parts of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and hydrogen peroxide were added in order to evaluate myeloperoxidase activity, according to Suzuki et al. (1983). After 30 min, the reaction was stopped with acid solution and the absorbance was quantified at 450 nm. The number of adhered neutrophils was calculated correlating absorbance of each well to a standard curve made with known neutrophils quantity.

NF-κB activation

The activation of NFκB was evaluated after treatment with LYSO-7 in the presence of fMLP (10^{-7} µM). An NF-κB double-stranded consensus oligonucleotide probe (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') was end-labelled with [γ^{32}P]-ATP (specific activity 3000 Ci/mmol) in the presence of T4 polynucleotide kinase (10 min, 37ºC; Sigma, St. Louis, MO, USA). Unincorporated nucleotides were removed in a Sephadex G-25 spin column; 4 µg of nuclear extracts was incubated with a gel shift

binding buffer [10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid pH 7.5; 50 mM KCl; 1.0 mM $MgCl_2$; 0.5 mM EDTA pH 8.0; 0.5 mM dithiothreitol; 4% glycerol; and 1.0 µg poly(dI-dC) poly(dI-dC)] in a total volume of 20 µL for 20 min at room temperature. Each sample was then incubated with 20,000–50,000 c.p.m. of the radiolabelled probe (30 min, room temperature). Protein–DNA complexes were resolved by non-denaturing 6% acrylamide⁄bisacrylamide (37.5:1.0) in a 0.25 Tris-borate⁄EDTA buffer at 150 V for 1.5 h at room temperature. The gels were dried and subjected to autoradiography. The blots were analysed by scanner densitometry (Image Master 1D®, Amersham Biosciences). Competitive binding assays were conducted under same conditions with the addition of 2 pmol (100-fold molar excess) unlabelled competitor oligonucleotide

Effects of LYSO-7 on neutrophil chemotaxis and calcium influx

To assess the chemotaxis neutrophils were incubated with vehicle or LYSO-7 for 1 h (37°C, 5% CO_2). After washing, cells were resuspended at a concentration of 6×10^6 cells/mL in RPMI containing 0.1% BSA and 25 µL was loaded on the top well of a commercially available Neuroprobe ChemoTx-101-3™ 96-well plate equipped with a 3 µm pore size filter (Neuroprobe, Leamington Spa, UK). As chemoattractant, 30 µL of fMLP 10^{-8} µM was added in the bottom well and incubated for 2 h (37°C, 5% CO_2). Migrated neutrophils were counted after a dilution in Turk's solution, using a Neubauer haematocymometer.

To evaluate the effects of PPAR pan on neutrophils calcium influx, $1x10^6$ neutrophils were treated or not with LYSO-7 (10 µM) during 1 hour. After that, the cells were incubated with Fluo-3-acetoxymethyl ester (Fluo-3 AM, eBioscience, San Diego, CA, USA, 2 µM) for 30 min, 37 ºC in the dark. The cells were washed (PBS,

37ºC, 2x) and incubated with PBS for 30 min at 37ºC in the dark, to conclude the esterification. Immediately after the analysis was added or not fMLP (10^{-6} mM). Data from 10.000 cells were obtained (lexc= 488 nm; lemi= 525 nm) and only the morphologically viable neutrophil were considered in the analysis. The experiments were conducted with a FACS Canto II flow cytometer (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA).

Statistical analysis

The means and standard error of the mean (SEM) of all data presented here were compared using Student's t-test or ANOVA. Tukey's multiple comparisons test was used to determine the significance of differences between values according to the experimental conditions. The statistical software GraphPad Prism® was used for this purpose. $p<0.05$ was considered significant.

RESULTS

fMLP-stimulated neutrophils predominantly express PPARγ, which is enhanced by LYSO-7

Data presented in Figure 1 show that *in vitro* stimulation with GPCR agonist fMLP increased PPARγ and β/δ protein by neutrophils. Higher expressions of PPARγ were observed if neutrophils were incubated with LYSO-7 or fMLP and LYSO-7 (Figure 1). The expression of PPARβ/δ were similar in fMLP or LYSO-7 incubated neutrophils (Figure 1).

LYSO-7 reduces *in vivo* and *in vitro* leukocyte-endothelial interactions

In the early stages of an inflammatory response, the leukocyte traffic is modified, with increasing number of rolling and adhered cells to the post-capillaries venules near the lesion site (Langer and Chavakis, 2009). This phenomenon can be easily observed in intravital microscopy after stimulation with phlogistic agents in microcirculatory network. Here, topical application of fMLP on the mesenteric microcirculation of animals increased the number of rolling and adhered cells. The pre-treatment with LYSO-7 was able to abolish the fMLP response, decreasing the number of rolling and adherent leukocytes (Figura 2A and B). The effect may be dependent on a direct action of LYSO-7 on neutrophil adhesion properties, as LYSO-7 inhibited in vitro fMLP-stimualted neutrophil adhesion to LPS-stimulated PMEC (Figure 2C).

LYSO-7 modulates gene and protein expression of adhesion molecules on neutrophils

Based on the previously data, we evaluated the molecular mechanism of LYSO-7 on neutrophil adhesion properties, by measuring gene and protein expression of CD62L and CD18 on LYSO-7-treated neutrophils. Data herein obtained demonstrate that LYSO-7 reduced the amount of CD62L (Figure 3A and B) and CD18 (Figure 4A and 4B) in basal and in fMLP-stimulated neutrophils. The effects seems to be dependent on gene expression, as mRNA levels for both adhesion molecules were reduced Figure 3C and D and 4C and D).

LYSO-7 impairs fMLP-induced neutrophil chemotaxis

We evaluate the direct actions of LYSO-7 on the fMLP induced neutrophils locomotory properties using chemotaxis assay. Figure 5 shows that neutrophils

treated *in vitro* with vehicle presented high migration front to the stimulus. On the other hand, LYSO-7 showed to be a stronger inhibitor of fMLP-induced neutrophil chemotaxis (Figure 5), as neutrophil migration was inhibited at 1μM. .

LYSO-7 impairs NF-κB activation and intracellular calcium mobilization

NF-κB is an important transcription factor that induces the synthesis of pro-inflammatory molecules. The measurement of its activity may be used to indicate the transcriptional activity (Collins et al., 1995). LYSO-7 pre-treatment impaired the NF-κB activation evoked by fMLP on neutrophils (Figure 6A).

It is well established in the literature that fMLP stimulation causes a transient increase in intracellular calcium, depending on the mobilization of intracellular stores and subsequent influx across the plasma membrane, which is essential for expression of adhesion molecules and neutrophil chemotaxis (Dufton and Perretti, 2010). The data here obtained show that fMLP promotes the release of large amount of calcium, which was inhibited by LYSO-7 (10 mM) (Figure 6B).

DISCUSSION

Several studies have been reported the action of PPARα, β/δ or γ agonists on cell activation employing different *in vivo* and *in vitro* inflammatory models, including PMNs, monocytes, and lymphocytes. However, there are few data in the literature about the PPAR pan-agonists actions, which have the ability to activate all PPAR isoforms. It is important to emphasize that PPAR pan-agonist might overcome some

of the limitations associated with current PPAR specific agonist drugs, which manly include weight gain and cardiovascular risks (Balakumar et al., 2007; Feldman et al., 2008; Zhang et al., 2012). Here, using *in vitro* and *in vivo* assays we show that LYSO-7 promote gene and protein expression of PPARβ/δ and γ in neutrophils, leading to inhibition on leukocyte-endothelial interactions and chemotaxis evoked by fMLP.

We have recently shown that LYSO-7 inhibit neutrophil influx in the air-pouch model and ethanol/HCl-induced gastric ulcer model, and we have also suggested that the neutrophils is the target cell of LYSO-7 actions (Santin et al., 2013a; Santin et al., 2013b). These results drove us to continue the study of the effect of PPAR pan activation on leukocyte-endothelial interactions, which was performed through the intravital microscopy in the mesenteric microvasculature. Results demonstrated that activation of all PPAR isoforms by LYSO-7 is associated with significant reduction in leukocyte rolling and adhesion as evoked by fMLP. Furthermore, *in vitro* previous treatment with LYSO-7 on neutrophils stimulated with fMLP inhibited their adhesion on LPS-stimulated PMEC, showing the direct action of LYSO-7 on adhesive properties of neutrophils. The recruitment of inflammatory cells into lesion site is mediated by adhesion molecules, by evoking rearrangements of actin focal adhesion, which provides basis for the firm adhesion, and consequently neutrophils migration into the lesion site (Green et al., 2003, 2004; Kolaczkowska e Kubes, 2013). The decrease in rolling and adhesion interaction in mice treated *in situ* and *in vitro* with LYSO-7, shown the regulation of adhesion molecules expressions and/or function by LYSO-7. Truthfully, the literature shows that activation of PPARβ/δ and γ regulates the adhesion molecules expression in neutrophils and in the endothelium (Piqueras et al., 2008). Troglitazone a specific PPARγ agonist inhibit CD106 and CD54

expression on endothelial cells obtained from human saphenous vein (Chen et al., 2007). Imamoto et al., (2004) show that pioglitazone, a PPARγ agonist, suppressed the increase of CD18 expression on fMLP-activated leukocytes and CD106 expression on HUVEC cells after IL-1β activation. GW501516, a PPARβ/δ agonist, showed inhibition on CD106, CD62E and CD54 mRNA expression in endothelial cells stimulated with TNF-α (Piqueras et al., 2009). In this way, our results are consistent with the literature, and report, for the first time, that a PPAR pan-agonist inhibits the CD62L and CD18 gene and protein expression in fMLP-stimulated neutrophils.

The expression of CD62L and CD18 can be modulating by NF-κB, an important transcriptional factor, which is activated by endogenous and exogenous substances during inflammatory response. NF-κB activation results from IκB phosphorylation by IKK and its ubiquitination and subsequent degradation in the proteasome. NFκB then translocates to the nucleus where it binds to specific regions of DNA to induce the transcription of inflammatory genes. Our results show that LYSO-7 inhibits the NF-κB activation evoked by fMLP in neutrophils. Data from literature show that inhibition of NF-κB activity by prostaglandin J2 can occur in a PPARγ-dependent manner through inhibition of the dissociation of repressor complex (Richard et al., 2007). Interestingly, some studies show that prostaglandin J2 can inhibit NF-κB in HeLa cells, which do not express PPARγ, showing that PPAR agonist may act independently of PPARγ (Straus et al., 2000; Richard et al., 2007; Rossi et al., 2000; Straus et al. 2000; Alves et al. 2010). In this context, it is important to point out that PPAR agonists may develop multiple effects, and it may be not only via PPAR-dependent pathways (Hill et al., 1999; Dyroy et al., 2005; Cuzzocrea et al., 2006).

In addition, was evaluated the effect of LYSO-7 on chemotaxis evoked by fMLP. Chemotaxis is a process that requires focal adhesion sites, actin cytoskeletal polarization and microtubule reorganization to cell movement and orientation in response to chemotactic agents. The perfect pool of membrane receptors and their rearrangement on the cell surface during the migration is a crucial point (Ridley et al., 2003). Our results show that LYSO-7 blocked the chemotaxis induced by fMLP in all concentrations evaluated. fMLP is a chemoattractant that binds to seven domain transmembrane receptor coupled to the Gi family of G proteins. After binding to agonists, receptors activate the heterotrimeric G protein, which dissociates into α and βγ subunits, activating phospholipase C (PLC). PLC hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) generating inositol-tri-phosphate (IP3), which releases calcium from endoplasmic reticulum stores, and diacylglycerol (DAG), resulting in activation of protein kinase C (PKC) isoforms. Cytosolic calcium levels enhancement is a necessary condition for neutrophil response to formyl peptides and it occurs by an initial transient release from intracellular storage sites followed by a more delayed influx across the plasma membrane (Dufton and Perretti, 2010; Migeotte et al., 2006). In this way, the results obtained show that LYSO-7 blocked the calcium release, and consequently inhibited the neutrophil chemotaxis.

In conclusion, data herein obtained show that molecule PPAR pan-agonist LYSO-7 promote the inhibition of neutrophil-endothelial interactions under flow *in vivo* and *in vitro*. The anti-inflammatory properties on neutrophils are associated with inhibitory effects on adhesion molecule expression, NF-κB activation and calcium release. Taken together, these results suggest that PPAR pan molecules may be represent a new therapeutic strategy in inflammatory process.

Acknowledgments

The authors thank São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support (Grants No. 2010/17175-0 and 2011/01848-8). IR Pitta and SHP Farsky are fellows of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq).

FIGURES

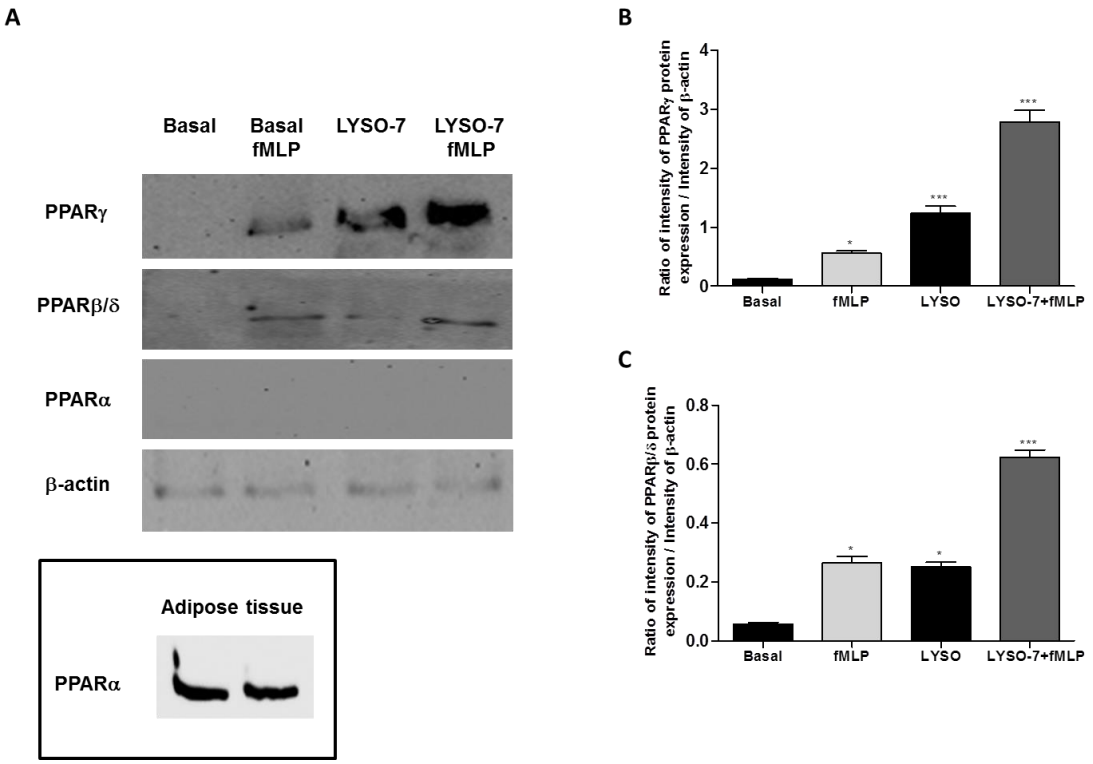


Figure 1. Effects of LYSO-7 on PPAR protein expression in macrophages. Peritoneal macrophages were treated with LYSO-7 and stimulated or not with fMLP during 2 hours. A) Representative image of gel electrophoresis; B) PPARγ protein expression on macrophages; C) PPARβ/δ protein expression on macrophages. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. *p<0.05, ***p<0.001 vs. basal.

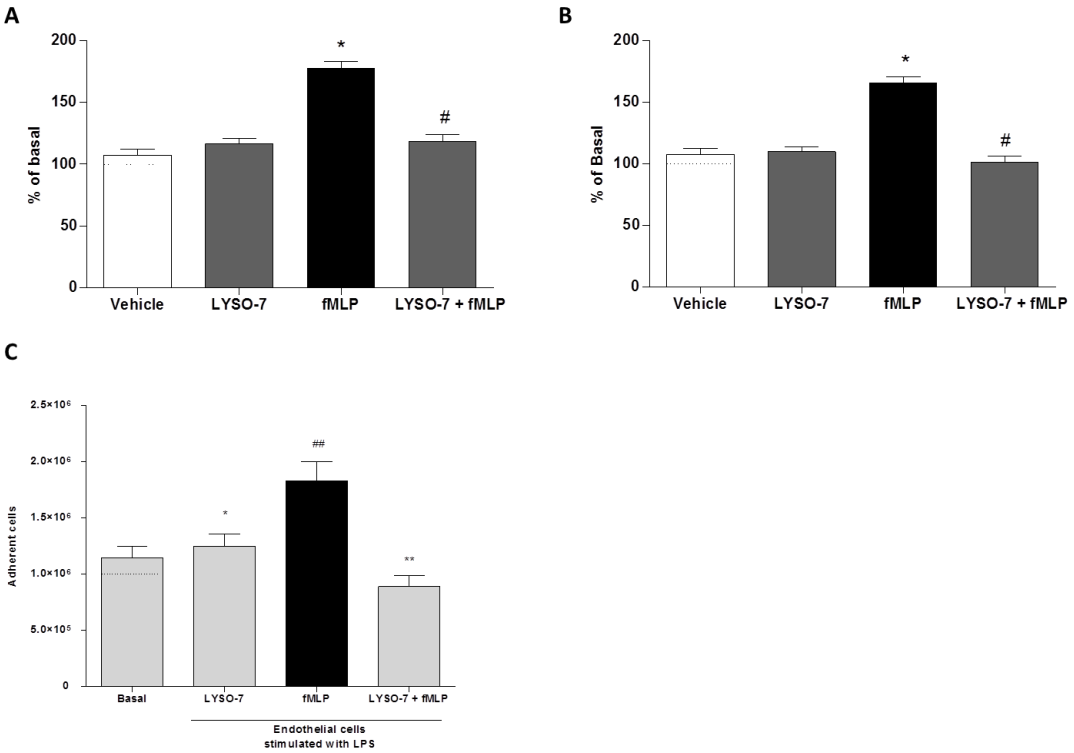


Figure 2. Effects of LYSO-7 on leukocyte-endothelial interactions *in vivo* and *in vitro*. A) Percentage of rolling leukocytes; B) Percentage of adherent leukocytes; C) Adhesion on endothelial cells stimulated with LPS *in vitro*. Results are expressed as mean ± SEM of 5 animals in each group. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs. fMLP

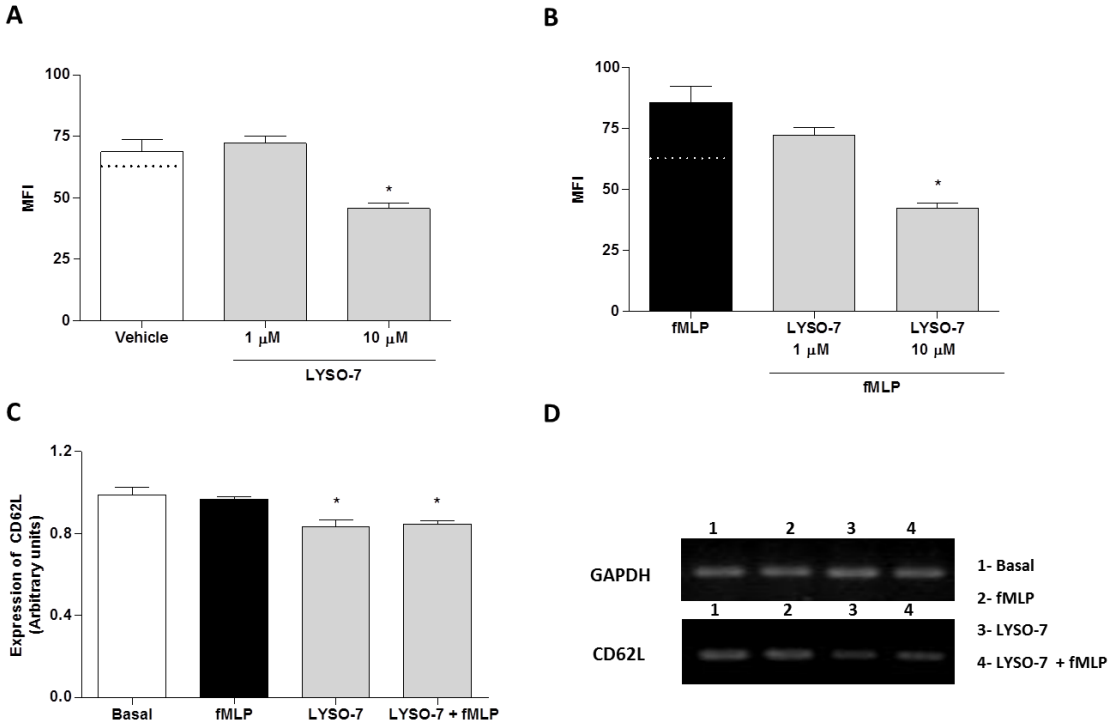


Figure 3. Effects of LYSO-7 on CD62L protein and gene expression. A) CD62L protein expression; B) CD62L protein expression; C) CD62L gene expression; D) representative image of gel. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. *p<0.05 vs. fMLP group.

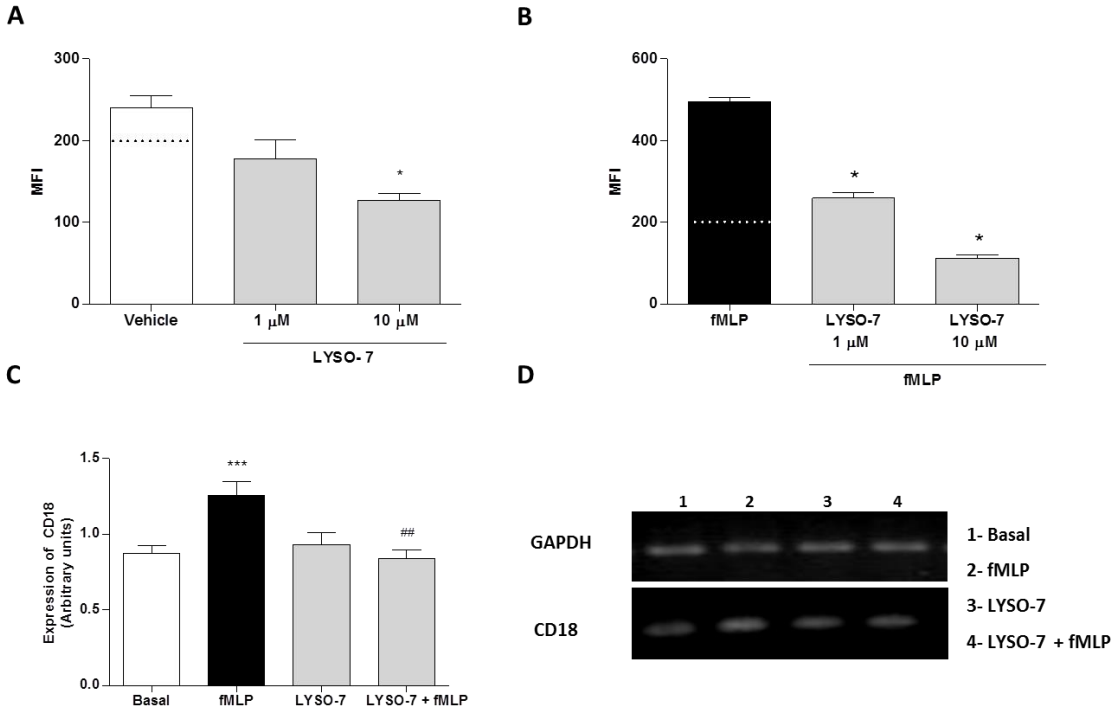


Figure 4. Effects of LYSO-7 on CD18 protein and gene expression. A) CD62L protein expression; B) CD62L protein expression; C) CD62L gene expression; D) representative image of gel. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. ***p<0.001 vs. basal group; *p<0.05 vs fMLP group.

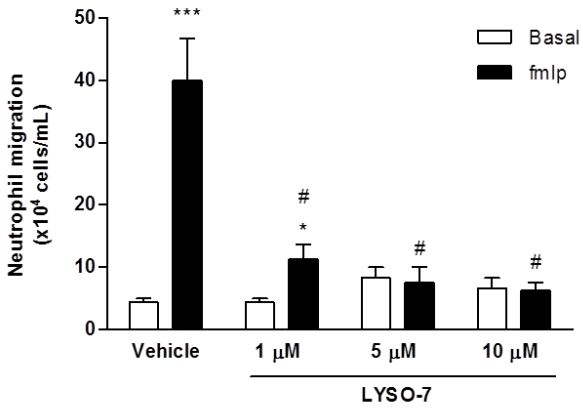


Figure 5. Effects of LYSO-7 on chemotaxis. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. ***p<0.001; *p<0.05 vs. basal vehicle; #p<0.05 vs. vehicle + fMLP.

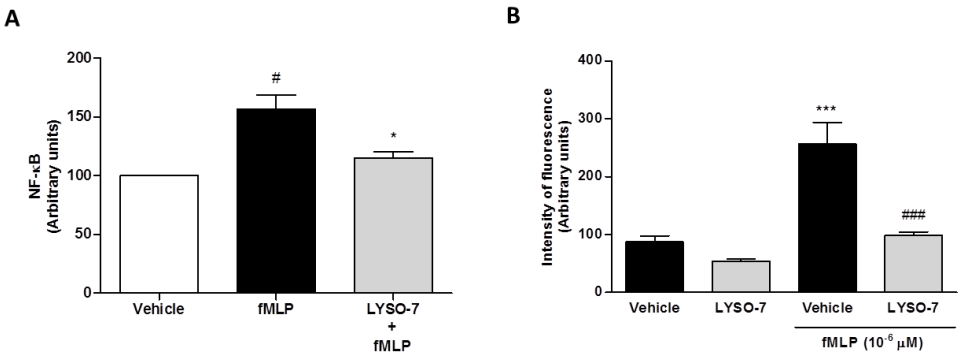


Figure 6. Effects of LYSO-7 on NF-κB activation and calcium influx. Results expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using AN followed by Tukey's test. ***p<0.001; *p<0.05 vs. vehicle without fMLP; #p<0.05 vs. vehicle + fMLP.