



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

JOÃO PEDRO DE SOUSA CÂNDIDO

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ORAL COM O COMPLEXO Ni(II)-Melofen NO
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DA LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

João Pessoa - PB
2025

João Pedro de Sousa Cândido

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ORAL COM COMPLEXO Ni(II)-Melofen NO
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DA LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Francisco
Alves.

Coorientadora: Giovanna Pinheiro
Martins

João Pessoa- PB
2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C217i Cândido, João Pedro de Sousa.

Influência do tratamento oral com o complexo
Ni(II)-Mefen no desenvolvimento experimental da lesão
pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo / João
Pedro de Sousa Cândido. - João Pessoa, 2025.
62 f. : il.

Orientação : Adriano Francisco Alves.
Coorientação : Giovanna Pinheiro Martins.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Inflamação. 2. Metalofármaco. 3. Patologia. I.
Alves, Adriano Francisco. II. Martins, Giovanna
Pinheiro. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 616-002

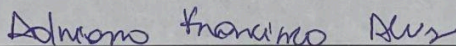
João Pedro de Sousa Cândido

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ORAL COM COMPLEXO Ni(II)-Melofen NO
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DA LESÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

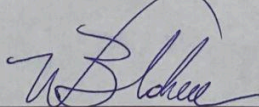
Aprovado em: 17/04/2025.

BANCA EXAMINADORA



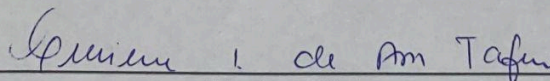
Orientador

Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
Universidade Federal da Paraíba



Membro Titular

Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa
Universidade Federal da Paraíba



Membro Titular

Profa. Dra. Luciene Simões de Assis Tafuri
Universidade Federal da Paraíba

Dedico este trabalho aos meus avós e aos meus pais, que não medem esforços para que eu conquiste meus objetivos e seja a minha melhor versão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, autor de todas as coisas e dentre elas a minha vida!

Agradeço a minha família por ser meu alicerce e suporte em tudo. Ao meu pai por ser exemplo de inspiração, determinação e coragem! À minha mãe por sempre acreditar em mim mesmo quando nem eu acredito, “João Pedro, eu acredito mais em você do que você mesmo”, essa frase mudou muita coisa em mim há 5 anos atrás e me deu forças para eu chegar até aqui, obrigado mãe, amo vocês!

Aos meus avós por serem exemplos de seres humanos na minha vida, por serem tão presentes, por me ajudarem tanto e abrir tantas portas para que eu pudesse ser quem eu quisesse ser. Eu escolhi ser Biomédico, e devo muito disso a vocês, lhes amo com todo o coração!

À minha irmã Sarah, por ser a pessoa no mundo inteiro que tenho a mais absoluta certeza que sempre poderei contar em tudo e para tudo, e assim saber que nunca serei sozinho. Te amo!

Agradeço a Rafa, meu amor. Por ser tão presente em tudo na minha vida, por me encorajar, acolher, aconselhar, por estudar comigo pré-véspera de provas e ser minha plateia de ensaio para todas as minhas apresentações junto com amora “Quando tu terminar eu também vou ser biomédico” kkk. Você me fez e faz uma pessoa melhor todos os dias, te amo!!!

Agradeço aos meus amigos que passaram de colegas de curso a minha família aqui, muito obrigado Suhellen, André, Paulo, Beatriz, Livia.

Aos meus amigos do LABIPEX, é incrível como no meio de tanta gente doida kkkk tenha tanto carinho envolvido, amo vocês!!!

Agradeço a Adriano por ser um professor, orientador tão presente, amigo e prestativo (quando crescer quero me parecer com você kkk). Muito obrigado por todos estes anos de ensino e troca, você tem um lugar especial na minha vida.

Aos professores que fizeram grande diferença na minha formação, Wallace, Luciene, Renato, Adriana que foram e são exemplos de pessoas e profissionais para a minha vida. Ao professor Jailton Ferrari, por gentilmente ter disponibilizado a molécula utilizada no estudo.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, é e sempre será um orgulho estar concluindo minha graduação aqui.

“Por tudo o que tens feito
Por tudo o que vais fazer
Por Tuas promessas e tudo o que És
Eu quero Te agradecer
Com todo o meu ser

Te agradeço, meu Senhor”

(Banda Diante do Trono)

RESUMO

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) é uma inflamação caracterizada pela presença de intenso infiltrado neutrofílico, resultado do aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar nos pulmões. As principais causas são a sepse, transfusão sanguínea e infecções por bactérias gram-negativas. Morfologicamente, observam-se alterações estruturais nas células do parênquima pulmonar, em consequência do aumento de citocinas e espécies reativas de oxigênio, que culminam na morte dessas células. O tratamento é, atualmente, baseado em terapias de suporte, como a ventilação mecânica; no entanto, essas terapias apresentam alto risco de colapso pulmonar. Além disso, não existe tratamento farmacológico padrão-ouro que reverta o quadro inflamatório presente. Desta feita, surge a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas, como os metalofármacos, que são substâncias amplamente pesquisadas quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios, já comprovados. Dentre eles, destaca-se o complexo metálico Ni(II)-Melofen por apresentar estudos *in vitro* que evidenciam essa ação. Com isso, o objetivo da pesquisa foi verificar a influência do tratamento com o complexo Ni(II)-Melofen no desenvolvimento da LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos. Para isso, camundongos machos Swiss foram experimentalmente desafiados com LPS para desenvolvimento da doença. Ao fim, foram realizadas análises macroscópicas, como aspecto, cor, tamanho e peso dos pulmões, associado a análises microscópicas por coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E). Os dados foram tabulados e analisados por análise de variância (ANOVA) *one-way* e pós-teste de Tukey, com nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com o complexo Ni(II)-Melofen foi capaz de, macroscopicamente, diminuir o tamanho dos pulmões e das lesões, além de reduzir o peso dos pulmões. Microscopicamente, houve o aumento dos espaços alveolares, diminuição da oclusão destes, diminuição do infiltrado neutrofílico e preservação da estrutura alveolar. Dessa forma, o tratamento com Ni(II)-Melofen mostrou-se uma promissora alternativa terapêutica para a LPA, por diminuir a inflamação gerada pelo LPS.

Palavras-chave: Inflamação. Metalofármaco. Patologia

ABSTRACT

Acute Lung Injury (ALI) is an inflammation characterized by the presence of intense neutrophilic infiltration, resulting from increased permeability of the alveolar-capillary barrier in the lungs. The main causes are sepsis, blood transfusions, and infections by gram-negative bacteria. Morphologically, structural alterations are observed in the cells of the pulmonary parenchyma, as a consequence of the increase in cytokines and reactive oxygen species, which ultimately lead to cell death. Treatment is currently based on supportive therapies, such as mechanical ventilation; however, these therapies carry a high risk of lung collapse. Additionally, there is no standard pharmacological treatment that reverses the present inflammatory condition. Therefore, the need arises for the search for new therapeutic alternatives, such as metallodrugs, which are substances widely researched for their already proven anti-inflammatory effects. Among them, the Ni(II)-Melofen metal complex stands out due to in vitro studies that demonstrate this action. Thus, the aim of the research was to assess the influence of treatment with the Ni(II)-Melofen complex on the development of LPS-induced API in mice. For this, male Swiss mice were experimentally challenged with LPS to develop the disease. At the end, macroscopic analyses were performed, such as the appearance, color, size, and weight of the lungs, along with microscopic analyses through Hematoxylin and Eosin (H&E) staining. The data were tabulated and analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test, with a statistical significance level of 5% ($p < 0.05$). The results demonstrated that treatment with the Ni(II)-Melofen complex was able to, macroscopically, reduce the size of the lungs and lesions, as well as decrease lung weight. Microscopically, there was an increase in alveolar spaces, a reduction in their occlusion, a decrease in neutrophilic infiltration, and preservation of alveolar structure. Thus, treatment with Ni(II)-Melofen proved to be a promising therapeutic alternative for API by reducing inflammation caused by LPS.

Keywords: Inflammation. Metallodrug. Pathology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
SRDA	Síndrome do Desconforto Respiratório
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
TLRs	Receptores Toll-like
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
PEEP	Pressão Expiratória Final Positivamente
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
NRLP3	Inflamassoma da Proteína 3 do Receptor Semelhante ao Domínio de Ligação dos Nucleotídeos
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento- β
VM	Ventilação Mecânica
LPIV	Lesão Pulmonar Induzida por Ventilação
LC	Ligante do Complexo
CM	Complexo Metálico
MF	Metalofármaco
SBs	Bases de Schiff
IPeFarm	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
CBiotec	Centro de Biotecnologia
DEXA	Dexametasona
H&E	Hematoxilina e Eosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
4.1 Anatomia e histologia dos Pulmões.....	14
4.2 Lesão Pulmonar Aguda.....	19
4.2.1 Fisiopatologia.....	21
4.2.2 Tratamento.....	24
4.3 Complexos Metálicos.....	25
4.3.1 Bases de Schiff.....	25
4.3.2 Metalofármacos.....	28
4.3.3 Complexo Ni(II)-Melofen VI.....	28
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
5 METODOLOGIA.....	34
5.1 Amostra.....	34
5.2 Tratamento com Ni(II)-Melofen VI.....	35
5.3 Modelo de Lesão Pulmonar Aguda.....	36
5.3.1 Eutanásia.....	37
5.4 Análise macroscópica dos pulmões.....	38
5.5 Peso úmido dos pulmões.....	38
5.6 Análises histológicas.....	38
5.7 Morfometria do tamanho dos pulmões.....	40
5.8 Análise estatística.....	40
5.8 Análise de Plágio.....	41
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1 Avaliação macroscópica.....	42
6.2 Avaliação microscópica.....	48
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

As síndromes respiratórias são doenças de alto acometimento da população mundial. Isso se deve a diversos fatores que estão aliados ao aumento populacional e o crescimento econômico que repercutem em uma sociedade de maus hábitos alimentares, sedentária e com maiores distúrbios metabólicos. Fatores estes, que propiciam um a emergência de doenças respiratórias (Tran *et al.*, 2023).

Dentre as lesões que acometem o trato respiratório em humanos, tem-se a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) a qual possui grande relevância clínica por ser adquirida de lesões nos pulmões de formas diretas e indiretas. Essa, destaca-se por seu alto nível de mortalidade representado entre 25 a 40% de todos os casos (Huppert; Ware, 2019).

Pelo fato da SDRA ser um problema de saúde pública mundial, muitas pesquisas têm-se voltado a compreender vários de seus aspectos e para busca de tratamentos eficazes. Assim, são propostos modelos experimentais murinos que mimetizam o início da síndrome, neste caso em camundongos, tem-se o modelo de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) (Ma *et al.*, 2023).

A LPA/SDRA, possui caráter inflamatório agudo que atinge os pulmões, envolvendo os capilares e os alvéolos pulmonares e prejudicando severamente a troca gasosa. Isso acontece devido ao dano às células dos alvéolos, contribuindo diretamente para o aumento da permeabilidade capilar, influxo de células inflamatórias e exsudato proteico, que culminam em edema alveolar e insuficiência respiratória (Huppert; Ware, 2019; Liu. *et al.*, 2021).

Os sinais e sintomas da LPA/SDRA baseiam-se em complacência pulmonar reduzida, infiltrados radiográficos difusos no tórax e hipoxemia refratária. Estes sinais são precursores do agravamento da doença, que quando não assistidos podem resultar no óbito do indivíduo (Oliveira; Teixeira; Rosa, 2019).

Atualmente, a fisiopatologia da LPA é de amplo conhecimento, no entanto, a intervenção terapêutica ainda se limita à terapia de suporte não farmacológica. Essa intervenção visa a não progressão da doença e restringe-se ao uso de terapias com corticosteróides. Diante disto, a busca por tratamentos farmacológicos efetivos contra a doença torna-se imprescindível para a diminuição da mortalidade (Meyer; Calfee, 2021; Silva *et al.*, 2024).

Neste contexto, os metalofármacos surgem como moléculas ou medicamentos que possuem a adição de um metal com o objetivo de atingir um alvo biológico. Estas moléculas possuem vários potenciais farmacológicos já descritos, dentre eles a redução de radicais livres e regulação negativa da inflamação. O complexo metálico Ni(II)-Melofen já foi estudado *in vitro* e exposto a linhagens celulares de câncer de cólon murino (CT-26) e humano (HCT-116) e apresentou resultados significativos relacionados a sua ação antiproliferativa e antiinflamatória. Dessa forma, é hipotetizado que a utilização do Ni(II)-Melofen pode ser eficaz no tratamento da LPA induzida por lipopolissacarídeo por apresentar um perfil de indução anti-inflamatório (Ceramella *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2022).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

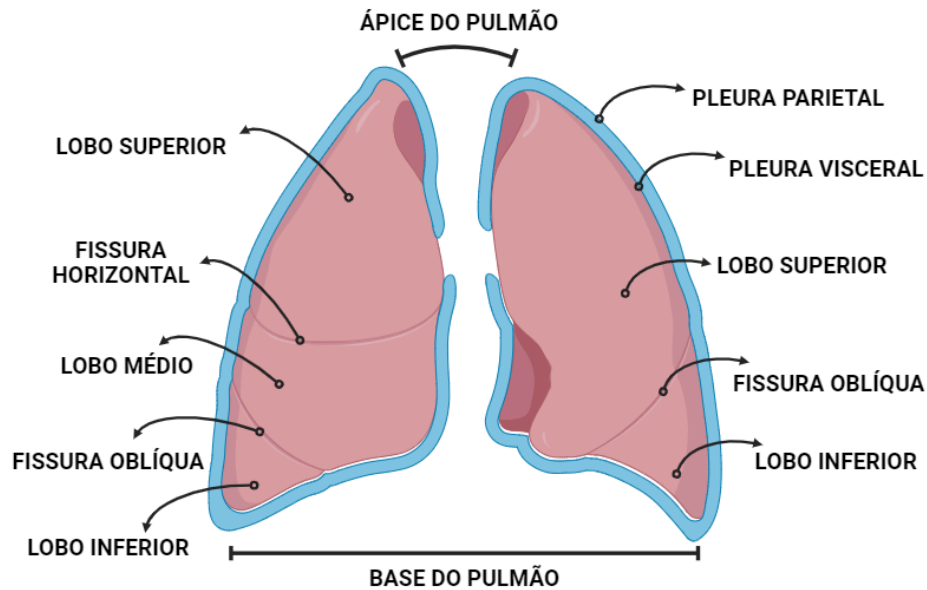
4.1 Anatomia e histologia dos Pulmões

Os pulmões são órgãos essenciais na homeostase do corpo humano. Sua principal função é a hematose, processo que mantém a troca gasosa entre o sangue oxigenado e não oxigenado. Além disso, participam do equilíbrio ácido básico do corpo e desempenham papel crucial no metabolismo energético (Tynko *et al.*, 2022).

Os pulmões estão anatomicamente localizados na cavidade torácica, ocupando a maior parte dessa, sendo estes revestidos por pleuras. As pleuras são subdivididas em pleura visceral que reveste toda a superfície dos pulmões e lhe conferem o aspecto brilhoso, e a pleura parietal que reveste todas as cavidades pulmonares. O espaço encontrado entre as duas pleuras é chamado de cavidade pleural. Um espaço virtual, banhado por líquido pleural que é responsável por garantir o deslizamento das pleuras uma sobre a outra durante o processo de respiração (Krishna; Antoine; Rudrappa., 2024).

Os pulmões apresentam a seguinte estrutura topográfica: o ápice, que é a extremidade arredondada superior localizada ao nível da primeira costela, e a base, a face côncava inferior que repousa sobre o diafragma. O pulmão direito é o maior, mais largo e mais pesado. Possui duas fissuras, uma direita oblíqua e uma horizontal as quais o dividem em três lobos, o lobo superior, médio e inferior (Figura 1). Já o pulmão esquerdo é dividido por uma única fissura oblíqua em dois lobos, superior e inferior (Moore; Dalley; Agur, 1114).

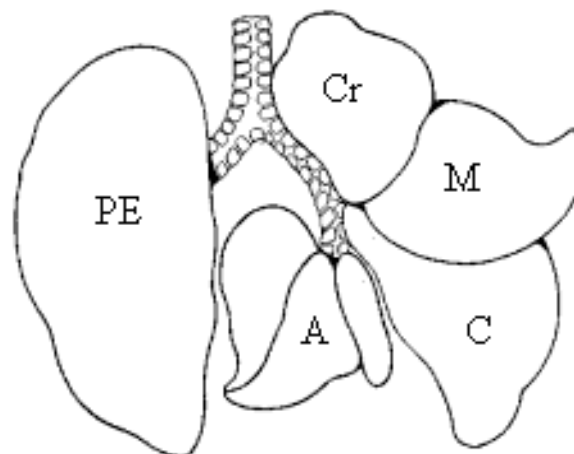
Figura 1: Demonstração esquemática da anatomia dos pulmões humanos.



Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

Diferente do que é observado em murinos, como os camundongos. Estes possuem 4 lobos constituindo o pulmão direito, sendo eles: cranial, médio, caudal e acessório. Enquanto o pulmão esquerdo possui 2 lobos, 1 superior e 1 inferior conforme observado na figura 2 (Treuting et al, 2017).

Figura 2: Demonstração esquemática da anatomia dos pulmões murinos.



Fonte: Júnior, Carvalho, Cataneo, 2009.

A função respiratória não se restringe apenas aos pulmões, mas também inclui os tubos que conectam os órgãos ao ambiente externo. O sistema respiratório é, portanto, dividido em duas porções principais: a porção condutora e a porção respiratória. A porção condutora é composta por um sistema de ductos, incluindo as fossas nasais, nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. Já a porção respiratória, responsável pela troca gasosa, é formada pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos. Sendo estes últimos responsáveis pela maior parte do volume pulmonar (Ball; Padalia., 2023).

Histologicamente, a parte condutora do sistema respiratório é revestida por um epitélio pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes, conhecido como epitélio respiratório. Apesar de sua presença em todo o sistema condutor, esse epitélio não participa do processo de troca gasosa. O epitélio respiratório é composto por cinco tipos de células, dispostas em ordem decrescente de abundância: células colunares ciliadas, células caliciformes, células em escova, células basais e células granulares (Khan; Lynch, 2023; Poewrs; Dhamoon, 2023).

A traqueia é a primeira estrutura da porção condutora a se ramificar, originando os brônquios primários. Estes, por sua vez, se dividem em três brônquios secundários no pulmão direito e dois no pulmão esquerdo. A partir dessas ramificações, formam-se brônquios de calibres cada vez menores, conhecidos como bronquíolos. Os bronquíolos se subdividem entre cinco e sete bronquíolos terminais, que se ramificam em brônquios respiratórios. Esta ramificação marca a transição para a porção respiratória do sistema, que inclui os ductos alveolares, sacos alveolares e os alvéolos (Ball, M.; Padalia, D., 2023).

Os brônquios respiratórios (BRs) possuem em sua superfície interna um revestimento por epitélio simples, que varia entre colunar baixo e cubóide. Este epitélio não apresenta células caliciformes, pode conter células em clava e, além disso, pode ter cílios em sua porção inicial. Na camada mais externa ao lúmen, o revestimento é constituído por músculo liso e fibras elásticas, formando a parede do bronquíolo (Khan; Lynch, 2023).

As paredes dos BRs apresentam descontinuidades que formam saídas alveolares, e, à medida que o bronquíolo se ramifica, essas descontinuidades aumentam. Na região onde há um maior número de saídas alveolares, o bronquíolo passa a ser chamado de ducto alveolar. Este ducto é constituído de músculo liso,

revestido por epitélio simples cúbico, com a presença de epitélio pavimentoso nas suas extremidades (figura 2) (Junqueira; Carneiro, 2023).

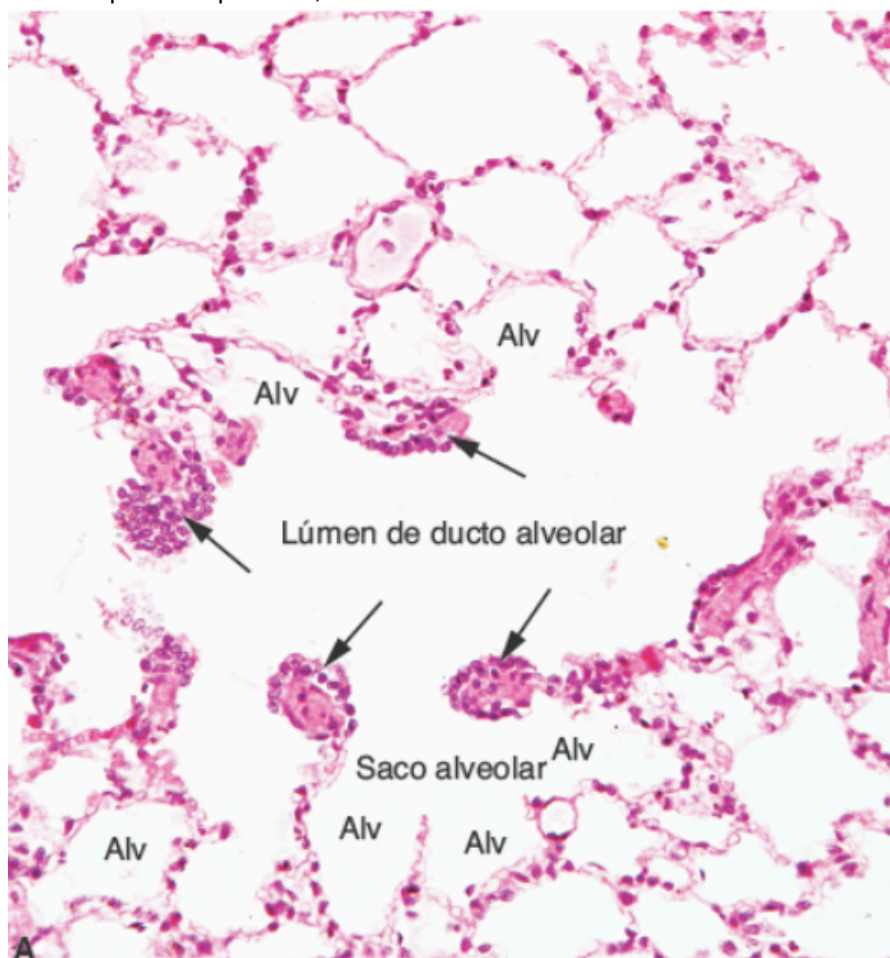
Figura 3: Corte histológico de pulmão corado em Hematoxilina e Eosina (H&E), evidenciando epitélio dos ductos alveolares



Fonte: Junqueira e Carneiro (2023).

Os ductos alveolares nas porções mais periféricas do sistema pulmonar apresentam um maior prolongamento e terminam em um alvéolo ou na maior parte, os sacos alveolares, espaços que possuem diversas saídas alveolares conforme demonstrado na figura 3. Os alvéolos são pequenas bolsas que apresentam uma abertura em sua estrutura. Cada alvéolo possui uma parede comum ao alvéolo subsequente, sendo estas paredes chamadas de septos. Os septos são compostos por duas camadas de células epiteliais, separadas por tecido conjuntivo com presença de fibras elásticas, reticulares e substância fundamental. Além disso, no interior do tecido conjuntivo dos septos, há uma rede de capilares sanguíneos, o que possibilita a troca gasosa (figura 4) (Chakraborty; Chen; Basnet, 2024; Junqueira; Carneiro, 2023).

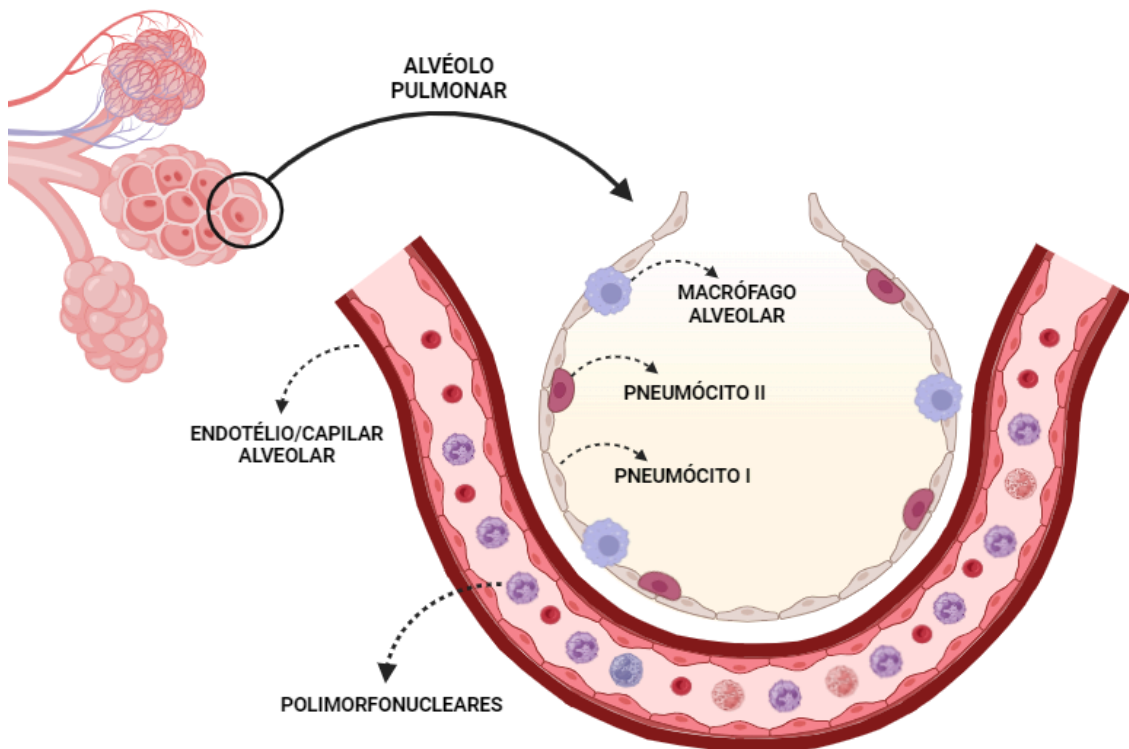
Figura 4: Corte histológico de pulmão corado em H&E. As setas pretas evidenciam o bronquíolo respiratório, ductos alveolares e sacos alveolares.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2023).

Os septos interalveolares possuem como revestimento dois tipos celulares, que ficam em contato direto com o ar que chega até ao lúmen dos alvéolos. O primeiro tipo são os pneumócitos do tipo I (figura 5), células com aspecto pavimentoso, citoplasma delgado e com núcleo achatado, além disso, são ligeiramente apresentadas para o interior do alvéolo. A capacidade de aderência dos pneumócitos tipo I entre si pela presença de desmossomos e zônulas de oclusão, permite que uma barreira estreita seja criada. Isso impossibilita que líquido intersticial ganhe estes espaços e que apenas a troca gasosa seja realizada entre o lúmen do alvéolo e os capilares (Junqueira; Carneiro, 2023).

Figura 5: Demonstração esquemática do alvéolo/capilar pulmonar.



Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

A segunda célula constitutiva dos alvéolos é o pneumócito tipo II (Figura 5), localizado na superfície dos alvéolos. Diferentemente dos pneumócitos tipo I, os do tipo II possuem um núcleo esférico e um citoplasma com aspecto vacuolizado, devido à presença de corpos multilamelares que contêm vesículas de fosfolípidios, proteínas e glicosaminoglicanos. Esses componentes são constantemente produzidos e secretados por exocitose, sendo denominado surfactante pulmonar (Sever *et al.*, 2021).

O surfactante pulmonar é uma substância que tem atividade crítica no desempenho da manutenção das tensões fisiológicas exercidas sobre a pressão pulmonar durante o movimento de troca gasosa. Desse modo, ele atua reduzindo a tensão superficial presente nos alvéolos. Permitindo que a respiração ocorra com um esforço mínimo, em indivíduos saudáveis (Possmayer *et al.*, 2023)

4.2 Lesão Pulmonar Aguda

A LPA é uma doença de caráter inflamatório agudo que envolve o parênquima pulmonar. É caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana

alvéolo-capilar, resultando em uma resposta inflamatória neutrofílica, diminuição da produção e ação do surfactante pulmonar, formação de membrana hialina e presença de exsudato proteico. Este último ganha os espaços alveolares prejudicando a troca gasosa fisiológica. Clinicamente, a lesão é observada por insuficiência respiratória, hipoxemia, redução da complacência pulmonar e presença de infiltrado inflamatório nos pulmões, observada em exame de imagem (Košutová; Mikolka, 2021; Liu *et al.*, 2021).

A lesão pulmonar tem duas possibilidades de origem. A primeira é através de agravos diretos, como pneumonia, inspiração de fumaça e infecções causadas por vírus, fungos ou bactérias gram positivas e negativas. Dentre as infecções por bactérias, destacam-se as bactérias gram-negativas. Uma vez que, essas possuem como constituinte da sua membrana externa o lipopolissacarídeo, um glicolípido altamente tóxico. A segunda forma de origem envolve insultos indiretos a órgãos, incluindo pancreatite, aspiração de conteúdo gástrico, traumas na região torácica e transfusão de sangue (Long; Mallampalli; Horowitz, 2022; Vlaar *et al.*, 2019).

A forma mais grave da lesão é a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), caracterizada por opacidades bilaterais em exame radiográfico, edema pulmonar não cardiogênico e hipoxemia. Sendo esta última um fator determinante sobre a taxa de mortalidade dos pacientes acometidos. Devido à baixa troca gasosa, estratégias como ventilação mecânica e pressão positiva de oxigênio são adotadas como meio de estadiamento da sintomatologia. Entretanto, a formação de membrana hialina, presença de exsudato proteico e infiltrado inflamatório no parênquima afeta diretamente a oxigenação alveolar (Rios; Iscar; Cardinal-Fernández, 2017; Oliveira; Teixeira; Rosa, 2019).

Em um estudo realizado em 2020 através do Sistema Oficial de Vigilância da Síndrome Respiratória Aguda sobre a mortalidade de pós-parturientes pela SDRA advinda da COVID-19 no Brasil, foi evidenciado que de todos os casos confirmados de morte por COVID-19 com agravo da SDRA nas pacientes pós-parto, a taxa de mortalidade por complicações da SDRA foi de 41,6% (Pereira *et al.*, 2021).

Em outros países como os Estados Unidos e Austrália, a incidência de LPA/SDRA varia de 17 a 64 casos por 100.000 habitantes por ano. Nestes casos a taxa de mortalidade ainda varia de 34 a 58% (Frutos-Vivar; Esteban, 2004).

Países subdesenvolvidos, como Ruanda, enfrentam um maior risco de complicações respiratórias devido à limitação de recursos econômicos que afetam

diretamente a saúde. Esses desafios contribuem para um aumento significativo na taxa de mortalidade, como a exemplo da LPA, representando 50% das mortes relacionadas a essas condições. Globalmente, a incidência de admissões em unidades de terapia intensiva por LPA e por SDRA é de 10,4% de todas as admissões, com uma taxa de mortalidade de 35,3% entre os pacientes (Peck; Hibbert, 2019).

Os pacientes acometidos pela forma mais grave da doença, quando conseguem um quadro de reversão da lesão, em sua maioria voltam a ter uma função respiratória significativamente normal. Porém, destes, muitos apresentam sequelas desenvolvidas pela lesão. Dentre estas, destaca-se principalmente a fraqueza muscular por descondicionalamento e comprometimento cognitivo (Meyer; Calfee, 2021).

Dessa forma, a LPA torna-se uma doença de grande relevância para a saúde pública por ter etiologia ramificada, atingindo assim os indivíduos de todas as esferas sociais e econômicas.

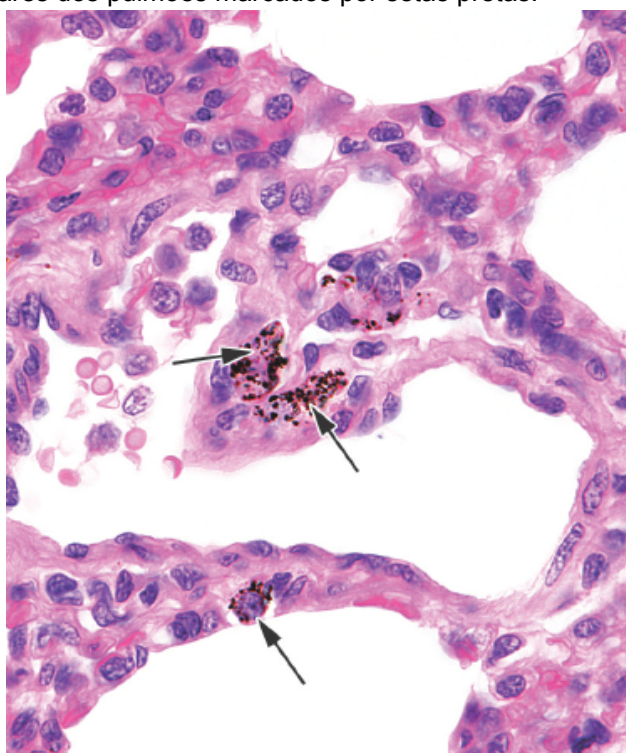
4.2.1 Fisiopatologia

A inflamação exerce papel fundamental no início da resposta imune inata. Neste sentido, durante o processo de estabelecimento fisiopatológico da LPA existem alguns eventos predominantes que ocorrem no desencadeamento da inflamação aguda. Este processo é dividido em três fases: exsudativa, proliferativa e fibrótica. A fase exsudativa é iniciada a partir de insultos indiretos ou diretos ao órgão. Uma das formas diretas é vinculada aos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular externa de bactérias gram-negativas. Sendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) capazes de desencadear as primeiras sinalizações moleculares envolvidas no processo de recrutamento das células envolvidas na inflamação aguda (Rahmawati, L. *et al.*, 2021).

O reconhecimento dos lipopolissacarídeos (LPS) é realizado pelos macrófagos alveolares (figura 6). Após esse contato, os macrófagos são ativados para o tipo 1 (M1), caracterizado por sua ação pró-inflamatória. Os macrófagos M1 desempenham um papel crucial no início do recrutamento das primeiras células envolvidas na lesão, mediado pelos receptores da família Toll-like (TLRs), especialmente pelo TLR4. A ativação do TLR4 nos macrófagos alveolares

desencadeia a ativação de vias inflamatórias, como a via do Fator Nuclear *Kappa-B* (NF- κ B), responsável por gerar várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), IL-1beta, IL-6 e IL-8 (Figura 6). Além disso, ocorre liberação de quimiocinas, como CCL2 e CCL7, que são responsáveis pelo recrutamento de monócitos, linfócitos T de memória e, principalmente, neutrófilos (Thompson; Chambers; Liu, 2017).

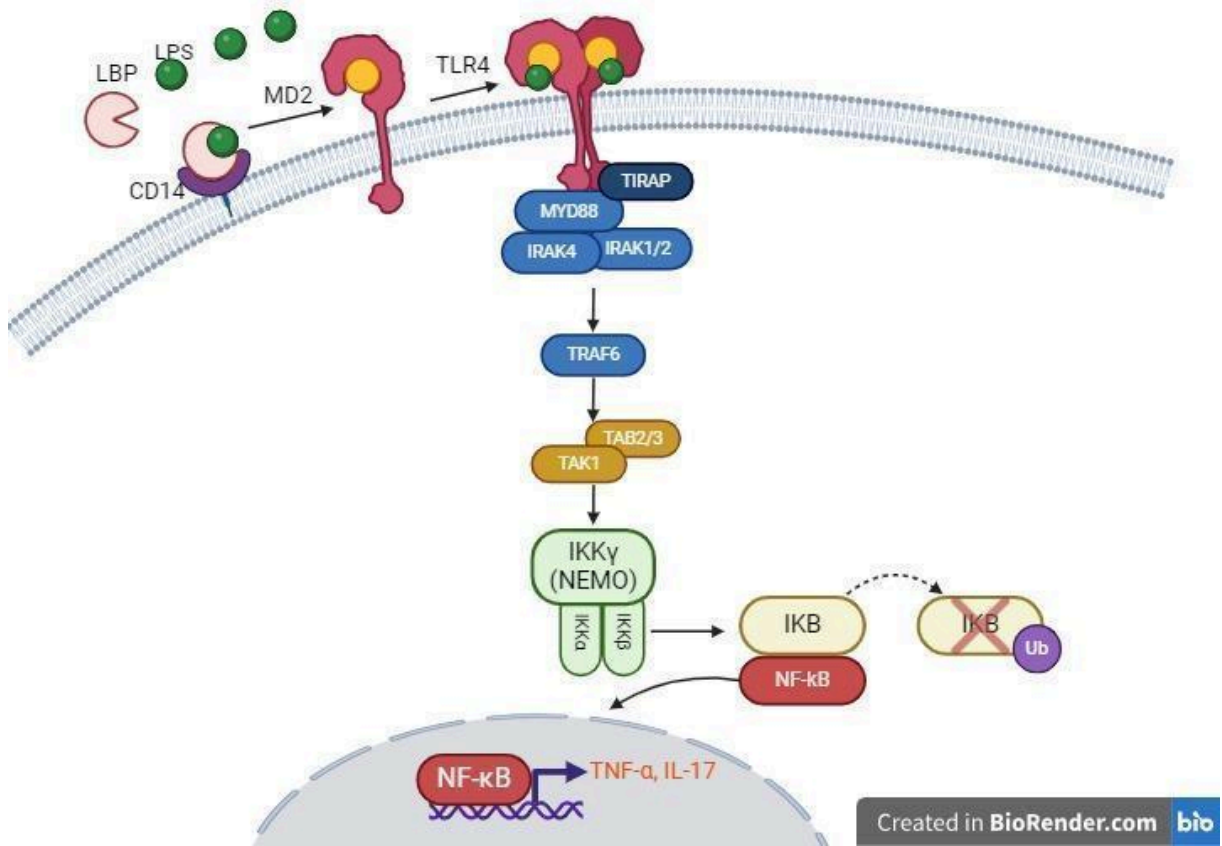
Figura 6: Corte histológico de pulmão corado em H&E evidenciando macrófagos alveolares/de poeira presentes nos ductos alveolares dos pulmões marcados por setas pretas.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2023).

A exacerbação da resposta inflamatória pela ação leucocitária origina uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta, promove danos oxidativos a células pulmonares, o que leva ao recrutamento de mais leucócitos e a ativação do inflamassoma da proteína 3 do receptor semelhante ao domínio de ligação dos nucleotídeos (NLRP3). Sendo o inflamassoma responsável pela aceleração da produção de mais citocinas pró-inflamatórias e assim mantendo a lesão (Thompson; Chambers; Liu, 2017).

Figura 7: Esquemática da via de sinalização do NF- κ B.



Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

A ativação de receptores, recrutamento de células e liberação de mediadores inflamatórios compreende a fase exsudativa, sendo a primeira do estágio inflamatório agudo. Nesta fase, ocorre a ruptura da barreira alvéolo-capilar resultando em edema composto por proteínas, células inflamatórias e citocinas. É então ocasionado a exposição de fatores teciduais nos tecidos lesionados pela influência do TNF- α . O resultado disto é a coagulação nos capilares sanguíneos e na parede alveolar, agregação plaquetária e geração de microtrombos. Devido a lesão às células epiteliais tem-se ausência de canais de íons suficientes que consigam reverter através das forças osmóticas o edema presente na cavidade alveolar (Mac; Sweeney; Mcauley, 2016; Thompson; Chambers; Liu, 2017)

A presença de citocinas como o TNF- α atuam sobre o endotélio vascular promovendo aumento da permeabilidade vascular resultando em exsudação proteica e expressão de moléculas de adesão chamadas integrinas e selectinas, que promovem o efluxo de células leucocitárias e o edema formado no espaço alveolar com a presença de células inflamatórias e depósitos de fibrina são geradores de

membranas hialinas, marca histológica da lesão observada por biópsia pulmonar em humanos. Essa fase é chamada de exsudativa/aguda, sendo clinicamente observada entre o 1° ao 6° dia após o início da lesão. Há insuficiência respiratória, devido ao exsudato proteico que permeia o endotélio e se acumula nos espaços aéreos. Além disso, há uma diluição e diminuição da produção de surfactante pelos pneumócitos tipo II, diminuindo a complacência pulmonar (Garcia; Pelosi; Rocco, 2008; Yang *et al.*, 2021; Bernardo, 2022).

A segunda fase da lesão pulmonar ocorre entre o 7° ao 14° dia, sendo caracterizada pela proliferação fibroblástica no interstício e espaços alveolares, deposição de matriz rica em fibronectina e metaplasia dos pneumócitos do tipo II (figura 4). Essa fase é vista como um mecanismo de reparo da lesão. Os pneumócitos do tipo II, além de secretar surfactante, desempenham um papel crucial na regeneração do epitélio alveolar (Aspal; Zemans, 2020; Sweeney; Mcauley, 2016; Walkey, A. *et al.*, 2012).

A regeneração da camada epitelial é essencial para permitir a depuração do fluido presente nos espaços alveolares para o interstício. Essa regeneração contribui para que haja a recomposição dos canais iônicos presentes na membrana alveolar e aconteça o efluxo do edema alveolar formado (Bernardo, 2022).

A fibrose é a terceira fase da lesão, geralmente observada a partir da segunda semana do início da agressão. Esta fase pode não ocorrer em todos os casos, pois, somente se desenvolve se a fase proliferativa anterior não tiver proporcionado o reparo necessário para a regressão ou estabilização da lesão. A fibrose é caracterizada pelo aumento de células miofibroblásticas, que resultam da metaplasia de fibroblastos presentes nestes órgãos. Essas células contribuem para uma maior deposição de matriz extracelular devido a fatores prófibróticos, como exemplo o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) o qual atua gerando hiperplasia e ativação de fibroblastos com deposição de fibras colágenas e fibrose (Cheung; Graziano; Smith, 2018; Ferreira, 2020).

4.2.2 Tratamento

A LPA é uma enfermidade com mecanismos fisiopatológicos bem descritos relacionados aos lipopolissacarídeos. No entanto, ainda não existe um tratamento farmacológico totalmente eficaz no controle da lesão e dos processos inflamatórios

subjacentes. Assim, o tratamento atual baseia-se no impedimento da progressão da doença através de terapias de suporte, como a utilização de corticosteroides. Além disso, tratamentos mais específicos não farmacológicos são empregados em casos mais graves da doença. Nesses casos, para manter a troca gasosa, é necessário o uso de ventilação mecânica (Sweeney; Mcauley, 2016).

Vários são os métodos não farmacológicos utilizados no tratamento da LPA/SRDA como os adjuvantes ao suporte respiratório feito pela ventilação mecânica (VM). Dentre eles, é destacado o posicionamento prono que facilita anatomicamente a entrada de oxigênio, bloqueio neuromuscular e suporte de vida extracorpóreo. Também são utilizados métodos como pressão expiratória final positiva (PEEP) e remoção extracorpórea de dióxido de carbono por perfusão (Silva *et al.*, 2024).

Devido às forças mecânicas exercidas durante a VM, lesões pré-existentes podem ser aumentadas ou novas lesões podem ser geradas ocasionando a Lesão Pulmonar Induzida por Ventilação (LPV), aumentando a taxa de mortalidade em 40% dos casos (Maron-Gutierrez *et al.*, 2009; Nardelli *et al.*, 2007).

Todos os métodos utilizados possuem o objetivo de auxiliar trocas gasosas associados à diminuição do edema formado (Maron-Gutierrez *et al.*, 2009).

4.3 Complexos Metálicos

4.3.1 Bases de Schiff

As bases de Schiff (SBs) são compostos orgânicos derivados da condensação de aminas primárias e compostos carbonílicos. Estas moléculas foram relatadas pela primeira vez por Hugo Schiff (imagem 1) em 1864 e ganharam grande notoriedade por sua potencialidade de variabilidade estrutural. Devido a isto, as SBs são amplamente utilizadas em diversas áreas, como: produção de pigmentos, corantes, catalisadores, estabilizadores de polímeros e intermediários em síntese orgânica (Kajal *et al.*, 2013).

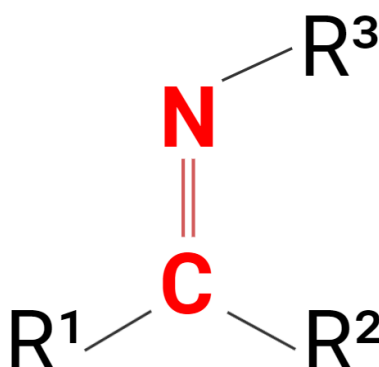
Imagem 1: Foto do químico Hugo Schiff.



Fonte: Timelessmoon, 2025.

A vasta utilização de SBs deve-se à estrutura molecular existentes nestas bases, sendo estes caracterizados pelo grupo imina ($-C=N-$) formado a partir de uma ligação do átomo de carbono com uma dupla ligação com o átomo de nitrogênio (Figura 7). As bases do tipo tetradentadas com sistemas de coordenação-N,N,O,O apresentam larga empregabilidade como ligantes de diversas espécies metálicas. Estes grupos são responsáveis por participarem de várias atividades biológicas, dentre estas, a de conferir propriedades antiproliferativas, antiinflamatórias e antimicrobianas (Ceramella *et al.*, 2022; Gavara *et al.*, 2020; Kajal *et al.*, 2013).

Figura 8: Esquematização estrutural do grupo funcional imina

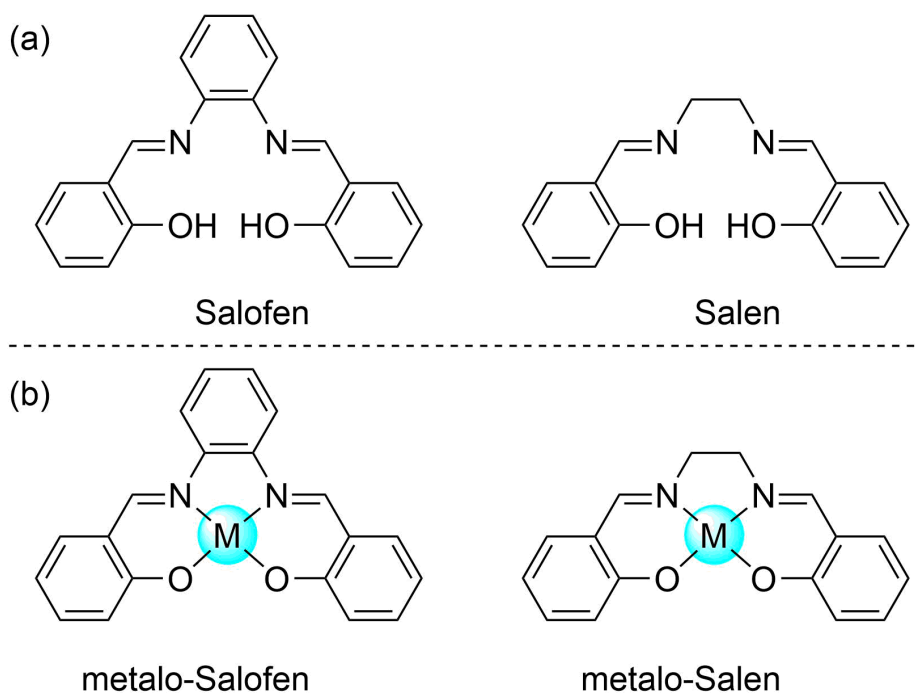


Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

As sínteses das SBs tetradentadas do tipo-N,N,O,O são, em geral, realizadas a partir das condensações de aldeídos/cetonas com diaminas como etilenodiamina

(ou seus derivados) e orto-fenilenodiamina (ou seus derivados), resultando na formação de ligantes amplamente conhecidos, respectivamente, como salen e salofen, tal como indicado na figura 8 (Fabbrizzi, 2020; Shaw, White, 2019)

Figura 9: Estruturas químicas de exemplos de compostos salen/salofen



Fonte: Jailton Ferrari, 2025.

A capacidade estabilizadora de centros metálicos em múltiplos estados de oxidação pelos ligantes salen e salofen na formação de complexos de coordenação estáveis tem permitido a aplicação desses complexos no desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos (Mazlan *et al.*, 2019), estudos de afinidade e seletividade em estruturas G-quadruplex-DNA (Kench *et al.*, 2023), no avanço de aplicações biológicas e biomédicas do tipo antimicrobiana, bem como no estudo do potencial quimioterápico desses complexos para o desenvolvimento de novos protótipos de metalofármacos antiproliferativos a partir de múltiplos mecanismos de ação (Arun, Kumar, Kamalesu, 2024; Pahontu *et al.*, 2019; Braga *et al.*, 2024).

As atividades antiproliferativas e antiinflamatórias das SBs tendem a ter maior potencialidade pela formação de complexos de SBs + Metais. Quimicamente isto é observado pela função quelante da fração azometina (figura 7), devido ao desemparelhamento dos elétrons do átomo de nitrogênio (Ceramella *et al.*, 2022).

As interações biológicas do grupo funcional das SBs é realizada pela participação do nitrogênio das iminas na ligação de hidrogênio nos centros ativos dos constituintes celulares. A partir destas ligações é possível que haja a interação nos processos celulares, possibilitando diversas alterações a depender do metal ligado a base e da célula-alvo (Avila *et al.*, 2020).

4.3.2 Metalofármacos

Os metalofármacos (MF) são moléculas sintetizadas a partir de um ligante como as bases de Schiff, com a adição de um metal de coordenação. Sendo estes definidos como metalofármaco pelo seu emprego como medicamento com forma farmacêutica definida. O principal objetivo da coordenação destes metais a moléculas de ligação é aumentar o efeito frente ao objetivo de tratamento (Ribeiro *et al.*, 2022).

Dentre os metalofármacos existentes e já utilizados como medicamento, tem-se a cisplatina, um dos primeiros medicamentos quimioterápicos a base de metal utilizado nos Estados Unidos. A cisplatina foi descoberta em 1845 e em 1965 foi descoberta sua propriedade inibidora da divisão celular, sendo este o início do processo de pesquisa do que viria a ser um metalofármaco empregado no tratamento contra cânceres testiculares, ovarianos, pulmonares e alguns outros (Ghosh, 2019).

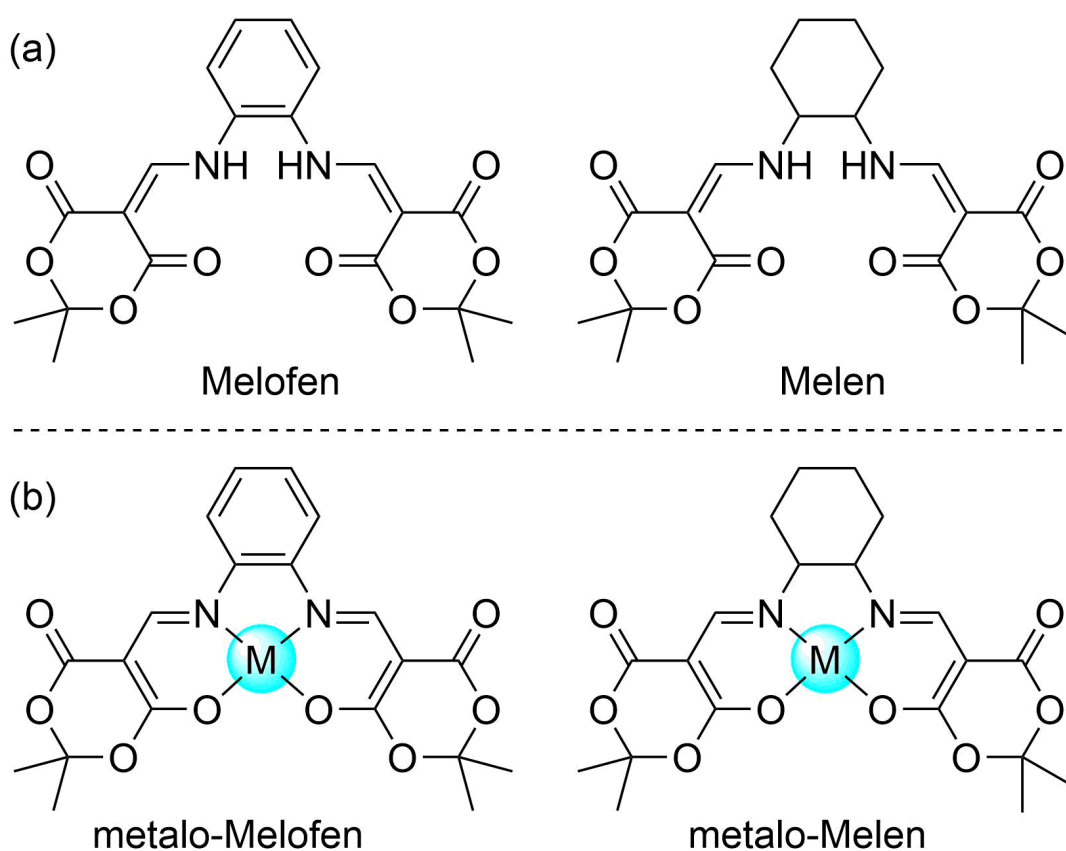
Entre as utilizações dos metalofármacos destaca-se a capacidade de alguns de reduzir os riscos associados às terapias medicamentosas convencionais pela associação deste durante a terapia medicamentosa. Assim, os MF buscam diminuir a toxicidade gerada por medicamentos, combater microrganismos resistentes a antibióticos, reduzir a geração de ROS, atuar negativamente na inflamação e proporcionar maior seletividade e especificidade, características que nem sempre são observadas em alguns fármacos convencionais (Utpal *et al.*, 2021).

4.3.3 Complexo Ni(II)-Melofen VI

A preparação e caracterização de derivados diaminoalquilidênicos do ácido de Meldrum são datados da primeira década do século XXI por Montalban e seus colaboradores (Montalban *et al.*, 2022). Esses compostos foram empregados como

ligantes do tipo tetradentados-N,N,O,O para formar os primeiros exemplos de complexos diamagnéticos do tipo bases de Schiff de Ni(II) e de Zn(II) designados àquela época como complexos do tipo-melen em referência ao ácido Meldrum como indicado na figura 9. Pode ser adequado também os denominar de melofen em referência a presença do ácido Meldrum. Fazendo assim uma clara analogia aos complexos de bases de Schiff conhecidos como salofen (Arun; Kumar; Kamalesu, 2024; Fabbrizzi, 2022).

Figura 10: Estruturas químicas de exemplos de compostos melen/melofen



Fonte: Jailton Ferrari, 2025.

Atualmente, a síntese de ligantes diaminoalquilidênicos do ácido de Meldrum (aqui denominados de melofen) tem sido reinvestigada visando o desenvolvimento de novos exemplos de complexos metálicos dessa classe de compostos para diferentes aplicações. Dentre elas, a preparação de complexos do tipo Manganês-melofen para uso em catálise biomimética (Sampaio, 2013), a síntese e estudos eletroquímicos de complexos dos tipos Cobalto-melofen e Cobre-melofen para o desenvolvimento de quimiossensores de detecção de dopamina e ácido

ascórbico (Nóbrega, 2020) e, por fim, a síntese e caracterização de complexos inéditos do tipo Paládio-melofen visando acoplamentos cruzados (Oliveira, 2022).

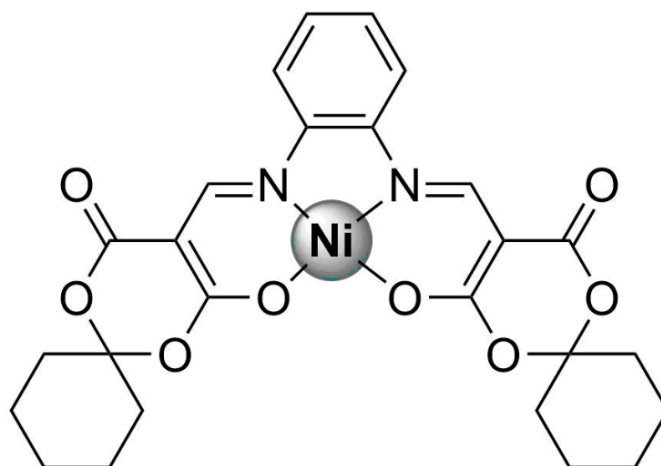
Do ponto de vista de investigações biológicas os complexos metalo-melofens têm sido estudados quanto às suas propriedades anti-angiogênicas usando modelo *ex vivo* HET-CAM e avaliações *in vitro* de suas atividades antiproliferativas frente às linhagens de células tumorais de glioma humano (U-373MG) e de câncer de mama humano (MDA-MB-231). Os resultados promissores decorrentes desses esforços iniciais demonstraram um efeito dual – anti-angiogênico e antitumoral simultâneo – para os exemplos de Pd(II)-melofen, Cu(II)-melofen e Co(II)-melofen investigados nesses estudos (Dantas, 2022; Dantas, 2024a; Dantas, 2024b). Embora esses achados não se constituam em um conjunto extenso de publicações, figuram, espelhando-se na trajetória de sucesso dos salens/salofens no combate ao câncer colorretal, como uma janela de oportunidade para investigações dessa classe de compostos e de seus potenciais de aplicabilidade biológica/farmacológica visando o desenvolvimento de uma nova classe de protótipos de metalofármacos – os metalo-melofens.

O complexo Ni(II)-Melofen VI descrito na figura 10 já foi utilizado em estudo *in vitro* com linhagens celulares de câncer de cólon murino (CT-26) e melanoma humano (HCT-116) e apresentou resultados significativos relacionados a sua ação antiproliferativa e antiinflamatória. Além disso, foi realizado estudo citotóxico apresentando uma IC₅₀ de 8,6 µM e análise de viabilidade celular por citometria de fluxo (Guava ViaCount) apresentando uma porcentagem melhor de células viáveis quando comparados a utilização de outras substâncias como a 5-fluorouracil, um medicamento quimioterápico amplamente utilizado (Ribeiro et al., 2022).

Dessa forma, é cabível a hipótese de que a ação deste metalofármaco na redução da geração citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, pode ser fundamental para o tratamento e controle da inflamação aguda, como a presente na LPA. Uma vez que participam do processo de lesão da membrana das células, desencadeando toda a cascata inflamatória, incluindo o recrutamento de células e a liberação de citocinas (Ribeiro et al., 2022).

Figura 11: Estrutura química do complexo Ni(II)-Melofen.

Complexo Ni-Melofen NiL2
Ni(II)-Melofen VI (Português)
Ni(II)-Melophen VI (Inglês)



Chemical Formula: $C_{26}H_{26}N_2NiO_8$
Molecular Weight: 553,19

Fonte: Jailton Ferrari, 2025.

2 JUSTIFICATIVA

A LPA é amplamente conhecida pelo seu envolvimento no estabelecimento de síndromes respiratórias. Destas, destaca-se a *Corona Virus Disease 2019* (COVID-19) a qual já alcançou mais de 5 milhões de mortes ocasionadas pelas complicações decorrentes da evolução da síndrome respiratória aguda grave (Enyue, 2022).

O estabelecimento da LPA e seu agravamento é acentuado pela ausência de terapia medicamentosa, uma vez que não há tratamento farmacológico padrão utilizado no tratamento. Sendo assim, há apenas tratamento de suporte que visa aumentar a disponibilidade de oxigênio para o indivíduo, como por exemplo a ventilação mecânica (Swenson, 2021).

Como possível alternativa farmacológica para esse agravamento, destacam-se os metalofármacos que são moléculas amplamente conhecidas pelo seu potencial farmacológico, uma vez que, possuem atividade de modulação negativa da inflamação. Dentre estes, o complexo metálico Ni(II)-Melofen VI destaca-se por promover ação anti-inflamatória e por sua vez anticancerígena já descrita (Ribeiro *et al.*, 2022). Dessa forma, é cabível a hipótese que esta molécula possua potencial farmacológico para a diminuição da inflamação ocasionada pela LPA, e assim, consiga diminuir os efeitos agravantes desta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a influência do tratamento oral com o complexo metálico Ni(II)-Melofen no desenvolvimento da Lesão Pulmonar Aguda induzida por lipopolissacarídeo em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar macroscopicamente os pulmões dos animais nas diversas condições experimentais;
- Avaliar histologicamente a topografia do exsudato inflamatório presente nos pulmões;
- Quantificar o peso úmido dos pulmões dos animais nas diversas condições experimentais.

5 METODOLOGIA

5.1 Amostra

A amostra foi composta por 28 camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Swiss. Os animais foram alocados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), que duas semanas anteriores ao início do experimento foram aclimatados em temperatura média de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12h, com acesso à ração adequada e água potável *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em 5 caixas de polipropileno com tampa zincada (gaiolas), cada uma contendo 8 ou 4 animais, a depender do grupo.

Para este estudo, foram definidos 5 grupos experimentais: Controle saudável (dimetilsulfóxido - DMSO), controle doente (LPA), LPA + Complexo metálico (LPA + CM), LPA + Ligante do Complexo (LPA + LC) e LPA + dexametasona (DEXA) (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição dos grupos da pesquisa

Grupo	Descrição	Nº
Controle Negativo (DMSO)	Camundongos sadios que receberão DMSO por gavagem oral	4
Controle Positivo (LPA)	Camundongos induzidos a LPA com LPS	8
LPA + CM	Camundongos com LPA que foram tratados com o complexo Ni(II)-Melofen VI	4
LPA + LC	Camundongos com LPA que foram tratados com ligante do complexo	8
LPA + DEXA	Camundongos com LPA que foram tratados com dexametasona (anti-inflamatório esteroideal)	4
TOTAL		28

Fonte: autor

Estimou-se uma variabilidade populacional (desvio-padrão) de 8% e uma diferença entre os grupos de 2% (média) para o principal parâmetro experimental (número se de células totais no grupo controle positivo - morfometria). Os valores de

alfa (erro tipo I) e beta (erro tipo II) foram 5% e 80% respectivamente. Levou-se em conta ainda uma mortalidade ou perdas por problemas de processamento de 15%.

O projeto foi submetido ao CEUA para análise de viabilidade do uso destes animais na pesquisa, obtendo parecer aprovado (CEUA: 3458191124) conforme visto no **ANEXO I**.

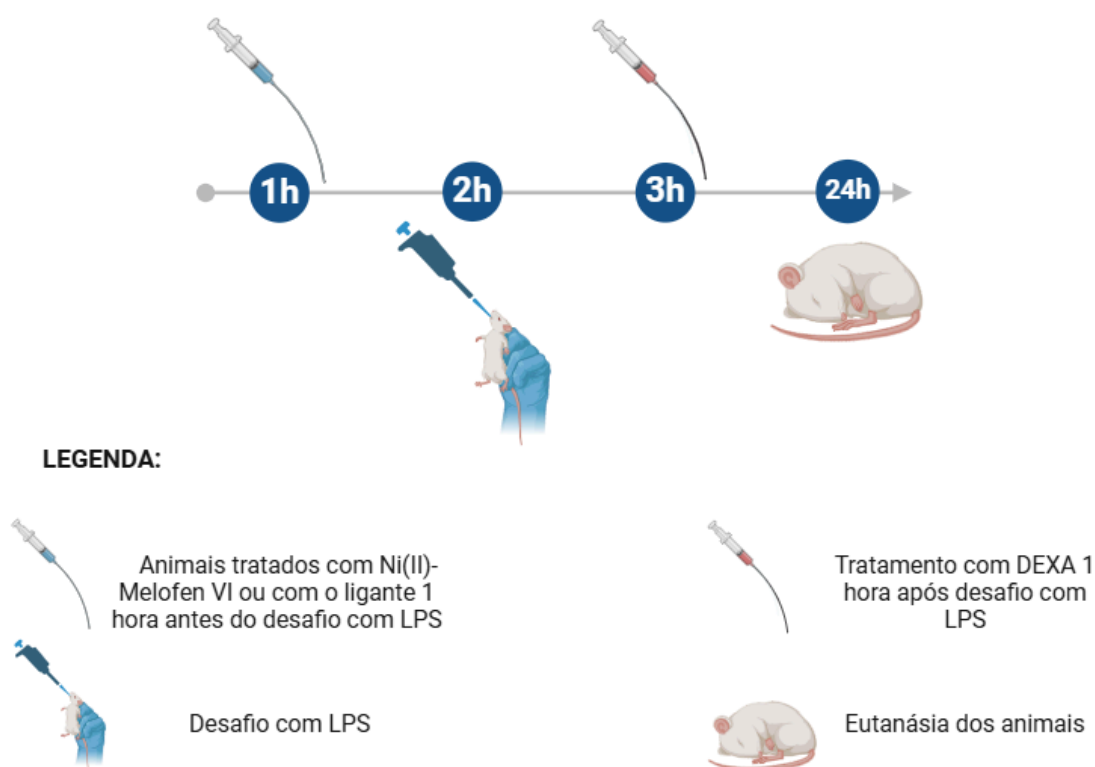
5.2 Obtenção do Ni(II)-Melofen VI

O metalofármaco Ni(II)-Melofen VI foi sintetizado e gentilmente disponibilizado pelo Prof. Dr. Jailton Ferrari do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba.

5.2 Tratamento com Ni(II)-Melofen VI

O tratamento com o complexo Ni(II)-Melofen VI foi feito com uma concentração de 100mg/kg para cada animal (Andrade *et al*, 2022). Após a pesagem do complexo metálico equivalente ao peso de cada animal, o preparo para administração aos animais aconteceu pela solubilização do mesmo em 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). O grupo LC foi tratado apenas com o ligante do complexo, sendo ele o Melofen-VI, para isso foi realizada a solubilização em 100 µL de DMSO. Após isto, 1 hora antes do desafio com LPS, conforme demonstrado na figura 11, ocorreu a gavagem por via oral nos animais do grupo CM, LC e gavagem do grupo DMSO apenas com o dimetilsulfóxido na dose de 100 µL.

Figura 12: Esquemática da linha do tempo em que foram realizadas as etapas do experimentos com os animais. Em 1 hora foi realizada a gravação com o complexo metálico no grupo CM e com o ligante do complexo no grupo LC. Em 2 horas foi realizado o desafio com LPS nos grupos LPA, CM, LC e DEXA. Em 3 horas foi realizado o tratamento com dexametasona por gavagem no grupo DEXA. Em 24 horas foi realizada a eutanásia em todos os animais de todos os grupos experimentais.

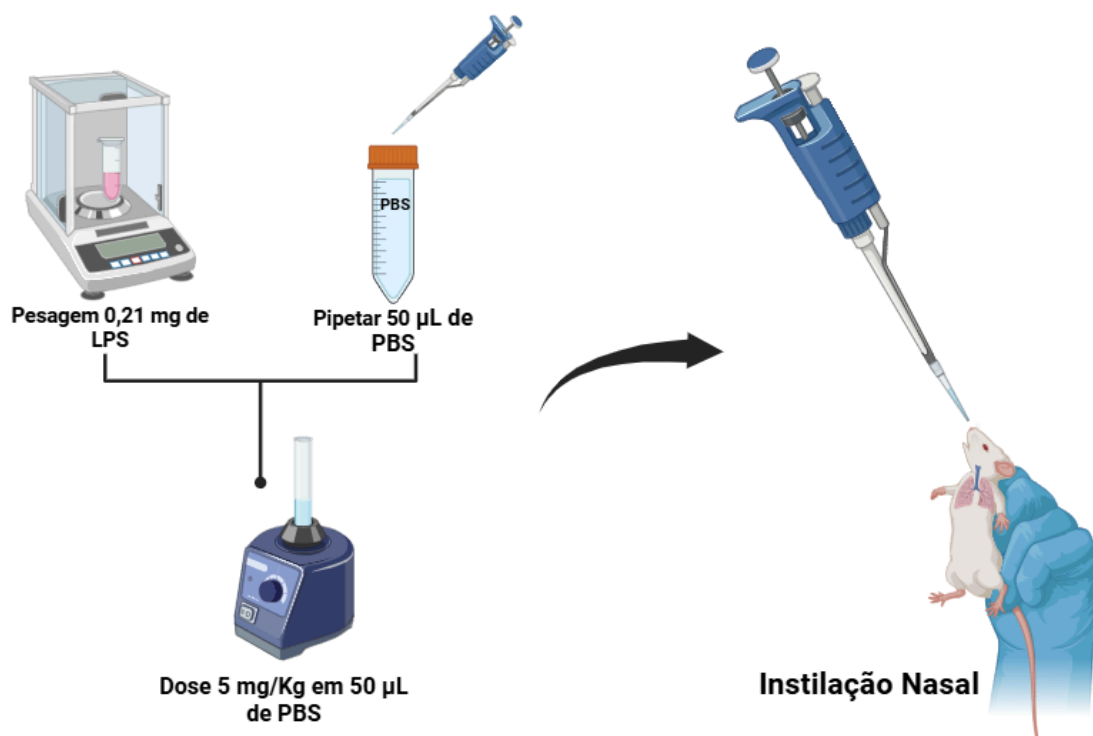


Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

5.3 Modelo de Lesão Pulmonar Aguda

A indução experimental da LPA ocorreu após 1 hora do tratamento com o complexo Ni(II)-Melofen VI. Para isto, os camundongos Swiss machos (n=24) foram previamente anestesiados com Cetamina (80 mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg), em seguida, receberam 5 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) diluídos em 50 µL de PBS feita por instilação nasal em todos os grupos conforme esquematizado na figura 12. Após 1 hora da instilação com LPS os animais do grupo LPA+DEXA receberam via gavagem oral a administração de 2mg/kg de dexametasona em 200 µL de PBS (Pacheco de Oliveira, 2015).

Figura 13: Esquematisação da instilação nasal com LPS nos camundongos.



Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

5.3.1 Eutanásia

Após 24 horas do desafio com LPS, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica (Cetamina 180 mg/Kg e Xilazina 30 mg/Kg) de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 37/2018. A confirmação da morte do animal foi realizada pela visualização da ausência de movimento respiratório (apnéia) conforme recomendado pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Após confirmação da morte, foi realizada uma laparotomia nos animais e os pulmões foram coletados, analisados macroscopicamente e encaminhados para a análise microscópica. Os animais eutanasiados foram acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração a -20°C. O recolhimento foi realizado por empresa especializada no descarte de material biológico da UFPB (Pontes *et al.*, 2024).

5.4 Análise macroscópica dos pulmões

Os pulmões foram avaliados macroscopicamente utilizando parâmetros como: cor, aspecto, tamanho e peso. Para a documentação, foram fotografados os pulmões representativos de cada grupo experimental através de um aparelho celular da marca/modelo Samsung S23 Ultra, dispostos ao lado de uma régua milimetrada .

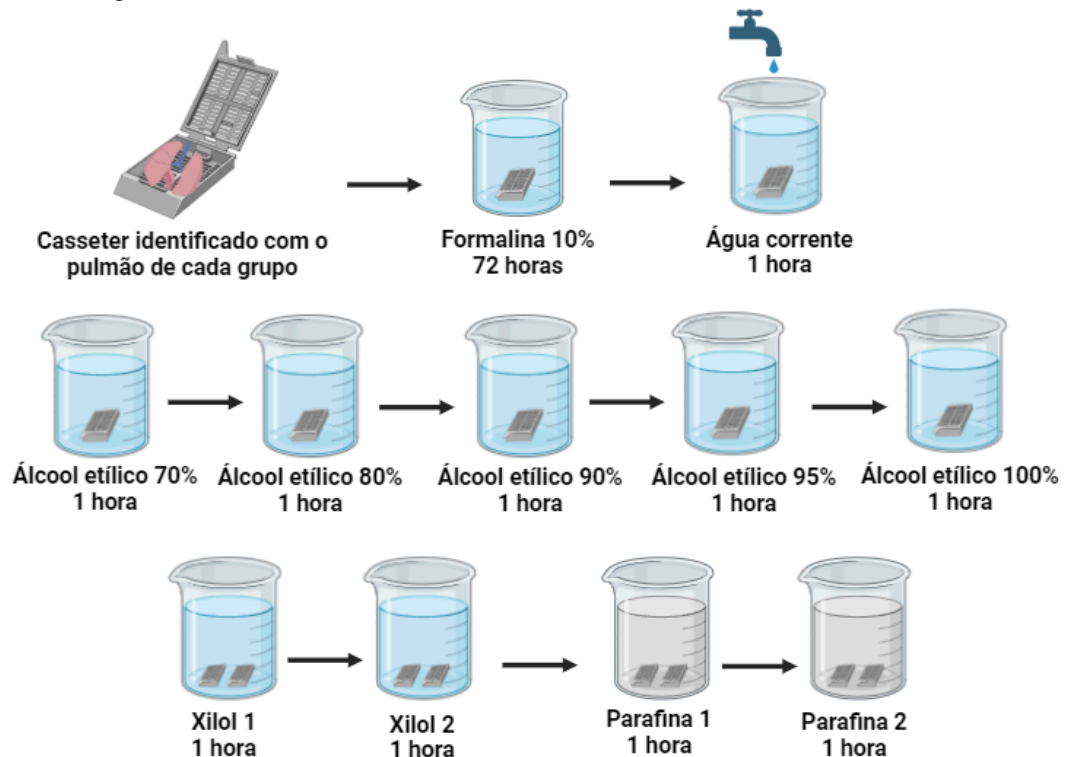
5.5 Peso úmido dos pulmões

Após realizada a laparotomia nos animais e coleta dos pulmões, estes foram pesados utilizando uma balança analítica de precisão (BEL engineering - modelo S213) e seus pesos foram expressos em gramas. A partir disso, os dados obtidos foram tabulados e realizados testes estatísticos para a identificação de potenciais diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

5.6 Análises histológicas

Após os pulmões serem coletados e fixados em formalina tamponada 10% por 72 horas, seguiu-se a inserção em cassetes histológicos previamente identificados . Logo após, as amostras foram lavadas em água corrente por 1 hora. Em seguida, foram submetidos ao processamento histológico padrão: desidratados em álcool etílico com gradações crescentes 70, 80, 90, 95 e 100%, diafanizados em 2 banhos de xilol e impregnados em parafina líquida, com duração de 1 hora em cada como apresentado na figura 13.

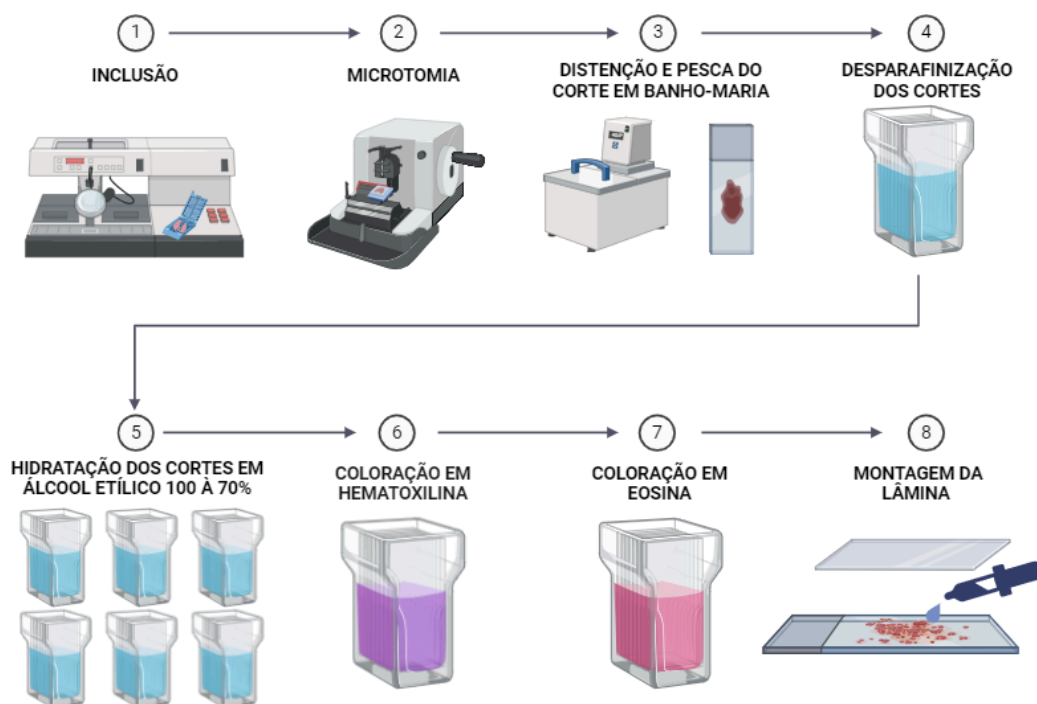
Figura 14: Esquematisação do processamento histológico para realização da microtomia e coloração das lâminas histológicas.



Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

Posteriormente, foram incluídos em blocos de parafina (figura 15). E então, houve a microtomia, realizada com espessura de 3 a 5 μ m com o auxílio de um micrótomo (Leica Biosystems - Leica RM2125 RTS). As fitas de parafina geradas foram então distendidas em banho-maria (Lupetec Tecnologia Aplicada - modelo BH 2015) com temperatura em torno de 40°C, para assim serem pescadas. Os cortes aderidos na lâmina foram desparafinados, reidratados e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) conforme descrito no **ANEXO II**, com o objetivo de observar-se células e componentes estruturais.

Figura 15: Esquematisação do processo realizado para a coloração da lâmina em H&E.



Fonte: Elaboração própria a partir da plataforma BioRender.

Para a análise das lâminas histológicas foi utilizado microscópio óptico de luz e fotografados com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio (Nikon DS-Ri2) os campos representativos de cada grupo experimental nas objetivas de 4x e 10x.

5.7 Morfometria do tamanho dos pulmões

A medição do tamanho dos pulmões de todos os grupos experimentais foi realizada a partir do *software* Image Pró-plus 4.0. Para isso, foi utilizada uma régua padrão para a calibração do tamanho em mm seguida da realização da medição de cada pulmão individualmente em cada um dos grupos experimentais avaliados.

5.8 Análise estatística

A análise estatística foi feita através do *software* Graphpad Prism versão 8.0. Foi realizado o teste de normalidade de forma a identificar se os dados são paramétricos, e após esta confirmação, os dados foram tabulados e analisados mediante análise de variância (ANOVA) *one way* e pós-teste de Tukey, com nível de

significância estatística de 5% ($p < 0.05$). De modo assim a estabelecer as diferenças encontradas entre os grupos experimentais.

5.8 Análise de Plágio

O presente trabalho foi analisado a partir do software de detecção de plágio CopySpider-2.5.6 de forma que obteve valor percentual de plágio $< 3\%$ conforme descrito no **ANEXO III**.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. H. et al. Estudo da atividade antitumoral de um novo complexo de Ru^{3+} : uma proposta para o design de metalofármacos de baixa toxicidade. **Química nova**, v. 45, n. 8, p. 906–912, 2022.
- ASPAL, M.; ZEMANS, RL Mecanismos de diferenciação de células ATII para ATI durante a regeneração pulmonar. **International journal of molecular sciences** , v. 21, n. 9, p. 3188, 2020.
- ARUN, T. R.; Kumar, H. P.; Kamalesu, S. Exploring the utilization of Schiff base metal complexes in biological settings: A review. *Inorganic Chemistry Communications*, 2024, 113251.
- AVILA-SORROSA, A. et al. Síntese, caracterização e atividade tripanocida preliminar in vitro de bases de Schiff hidroxiladas N-arilfluoradas. **Journal of molecular structure** , v. 1218, n. 128520, p. 128520, 2020.
- BALL, M.; PADALIA, D. **Anatomia, Vias Aéreas**. [sl] StatPearls Publishing, 2023.
- BERNARDO, L. R. **Avaliação do mecanismo de ação da milonina no modelo murino de lesão pulmonar aguda e estudos in silico**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022.
- CERAMELLA, J. et al. Uma revisão sobre a atividade antimicrobiana das bases de Schiff: Coleta de dados e estudos recentes. **Antibiotics** (Basel, Switzerland) , v. 11, n. 2, p. 191, 2022.
- CHAKRABORTY, R. K.; CHEN, R. J.; BASNET, S. **Status Asthmaticus**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2024.
- CHEUNG, O.-Y.; GRAZIANO, P.; SMITH, ML Lesão pulmonar aguda. Em: **Patologia Pulmonar Prática: Uma Abordagem Diagnóstica**. [sl] Elsevier, 2018. p. 125-146.e3.
- DANTAS, B. B. et al. Complexos metálicos de paládio baseados em ligantes simétricos derivados do ácido de Meldrum com ação antiproliferativa em células tumorais. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 1020220235856. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. Depósito: 21 nov. 2022.
- DANTAS, B. B. et al. Complexos melofen de cobre(II) com efeito antitumoral. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 1020240055365. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. Depósito: 20 mar. 2024a.
- DANTAS, B. B. et al. Efeito antitumoral de complexos metálicos de cobalto(II) análogos a compostos do tipo base de Schiff. Patente: Privilégio de Inovação.

Número do registro: BR 1020240187156. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. Depósito: 11 nov. 2024b.

DONOVAN, John; BROWN, Patricia. Blood collection. **Current protocols in neuroscience**, v. 33, n. 1, p. A. 4G. 1-A. 4G. 9, 2005. DOI: 10.1002/047114230.

FANG, E. *et al.* **Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 94, 2022.

FABBRIZZI, L. Beauty in chemistry: Making artistic molecules with Schiff bases. *The Journal of Organic Chemistry*, **2020**, 85(19), 12212-12226.

FERREIRA, L. A. M. P. **Efeito do alcalóide Curina nas vias de transdução de sinais TLR4/NFκB em granulócitos do pulmão no modelo experimental de lesão pulmonar aguda**. 2020. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

FRUTOS-VIVAR, F.; NIN, N.; ESTEBAN, A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Current opinion in critical care**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2004.

GARCIA, CSNB; PELOSI, P.; ROCCO, PRM Síndrome do desconforto agudo pulmonar e extrapulmonar: existem diferenças? **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 2, pág. 178–183, 2008.

GAVARA, L. *et al.* 4-Amino-1,2,4-triazole-3-thione-derived Schiff bases as metallo-β-lactamase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 208, n. 112720, p. 112720, 2020.

GONZÁLEZ-BALLESTEROS, M. M.; Mejía, C.; Ruiz-Azuara, L. Metallodrugs: an approach against invasion and metastasis in cancer treatment. *FEBS Open Bio*, **2022**, 12, 880-899.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic chemistry**, v. 88, n. 102925, p. 102925, 2019.

HOU, S.-M. *et al.* **Ruthenium complex, TQ-5, protects against LPS-induced macrophage inflammation and acute liver injury in mice via downregulating NF-κB pathways**. *International journal of molecular medicine*, v. 44, n. 1, p. 335–345, 2019.

HUPPERT, LA; WARE, LB **Patogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo. Seminários em medicina respiratória e de cuidados intensivos**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Junqueira & Carneiro Histologia básica: texto e atlas**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. E-book. (1 recurso online). ISBN 9788527739283.

KAJAL, A. et al. Schiff bases: A versatile pharmacophore. **Journal of Catalysts**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

KENCH, T.; RAKERS, V.; BOUZADA, D.; GOMEZ-GONZÁLEZ, J.; ROBINSON, J.; KUIMOVA, M. K.; LÓPEZ, M. V.; VÁZQUEZ, M. E.; VILAR, R. Dimeric Metal-Salphen Complexes Which Target Multimeric G-Quadruplex DNA. *Bioconjugate Chemistry*, **2023**, 34(5), 911-921.

KHAN, Y. S.; LYNCH, D. T. **Histology, Lung**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2023.

KOŠUTOVÁ, P.; MIKOLKA, P. Aspiration syndromes and associated lung injury: incidence, pathophysiology and management. **Physiological research**, v. 70, n. Suppl 4, p. S567–S583, 2021b.

KRISHNA, R.; ANTOINE, M. H.; RUDRAPPA, M. **Pleural Effusion**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2024.

Lista Nacional de Notificação Obrigatória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/notificacao-compulsoria/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria-de-doencas-agrivos-e-eventos-de-saude-publica>. Acesso em: 25 jul. 2024.

LI, J. et al. Obacunone alleviates ferroptosis during lipopolysaccharide-induced acute lung injury by upregulating Nrf2-dependent antioxidant responses. **Cellular & molecular biology letters**, v. 27, n. 1, p. 29, 2022.

LIU, C. et al. An integrated network pharmacology and RNA-Seq approach for exploring the preventive effect of *Lonicerae japonicae* flos on LPS-induced acute lung injury. **Journal of ethnopharmacology**, v. 264, n. 113364, p. 113364, 2021.

LIMA, W. J. M. et al. Obesity influences the development of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 31, p. e20230133, 2023.

LONG, M. E.; MALLAMPALLI, R. K.; HOROWITZ, J. C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 136, n. 10, p. 747–769, 2022.

MA, A. et al. Caracterização da assinatura relacionada à ferroptose e da infiltração imunológica em lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo. **Respiratory research**, v. 24, n. 1, p. 154, 2023.

MAC SWEENEY, Rob; MCAULEY, Daniel F. Acute respiratory distress syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10058, p. 2416-2430, 2016.

MARON-GUTIERREZ, T. et al. Terapia com células-tronco na síndrome do desconforto respiratório agudo. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 21, n. 1, p. 51–57, 2009.

MAZLAN, N.-F.; Tan, L. L.; Karim, N. H. A.; Heng, L. Y.; Reza, M. I. H. Optical biosensing using newly synthesized metal salphen complexes: A potential DNA diagnostic tool. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**, 242, 176-188.

MEYER, NJ; CALFEE, CS Síndrome do desconforto respiratório agudo. *Lancet*, v. 398, n. 10300, p. 622–637, 2021.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. Anatomia orientada para a clínica. 7 Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 1114.

MONTALBAN, A.G.; Alonso, J.; White, A.J.P.; Williams, D.J. 'Melen complexes': a new family of Schiff base metal chelates derived from di-Meldrum's acid derivatives. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51, 5543–5545.

NARDELLI, L. M. et al. Entendendo os mecanismos determinantes da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 19, n. 4, p. 469–474, 2007.

NÓBREGA, E. T. D. Novos complexos de Co(II) e Cu(II) com ligantes Melofen: síntese, caracterização, estudo eletroquímico e aplicação na detecção simultânea de dopamina e ácido ascórbico – Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), **2020**, João Pessoa, Brasil.

OLIVEIRA, D. A. A. Síntese e caracterização espectroscópica de complexos de Pd(II) baseados em ligantes simétricos do tipo melofen – Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), **2022**, João Pessoa, Brasil.

OLIVEIRA, R. P. DE; TEIXEIRA, C.; ROSA, R. G. Acute respiratory distress syndrome: how do patients fare after the intensive care unit? **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 31, n. 4, p. 555, 2019.

PAHONTU, E.; Proks, M.; Shova, S.; Lupaşcu, G.; Ilieş, D.-C.; Bărbuceanu, Ş.-F.; Socea, L.-I.; Badea, M.; Păunescu, V.; Istrati, D.; Gulea, A.; Drăgănescu, D.; Pîrvu, C.E.D. Synthesis, characterization, molecular docking studies and in vitro screening of new metal complexes with Schiff base as antimicrobial and antiproliferative agents. *Applied Organometallic Chemistry*, **2019**, 33, e5185.

PACHECO DE OLIVEIRA, Maria Talita et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 400-412, 2015.

PECK, T. J.; HIBBERT, K. A. Recent advances in the understanding and management of ARDS. **F1000Research**, v. 8, p. 1959, 2019.

NAKAMURA-PEREIRA, M. et al. O impacto da pandemia de COVID-19 na mortalidade materna no Brasil: 523 mortes maternas por síndrome do desconforto respiratório agudo potencialmente associadas ao SARS-CoV-2. **Revista internacional de ginecologia e obstetrícia: órgão oficial da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 153, n. 2, p. 360–362, 2021.

PONTES, J. C. X. et al. Photodynamic therapy repairs medication-related osteonecrosis of the jaw by reducing NF-kB protein in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 32, p. e20230447, 2024.

POSSMAYER, F. et al. Surfactante pulmonar: Uma película muito fina. **Chemical reviews**, v. 123, n. 23, p. 13209–13290, 2023.

POWERS, K. A.; DHAMOON, A. S. Physiology, Pulmonary Ventilation and Perfusion. [s.l.] **StatPearls Publishing**, 2023.

Resolução Normativa CONCEA nº 37/2018 - Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_37_de_15022018.html. Acesso em: 17 de set. 2024.

RAHMAWATI, L. et al. Cissus subtetragona Planch. Ameliorates inflammatory responses in LPS-induced macrophages, HCl/EtOH-induced gastritis, and LPS-induced lung injury via attenuation of Src and TAK1. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 19, p. 6073, 2021.

RIBEIRO, N. et al. Metal coordination and biological screening of a Schiff base derived from 8-hydroxyquinoline and benzothiazole. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2583, 2022.

RIOS, F.; ISCAR, T.; CARDINAL-FERNÁNDEZ, P. What every intensivist should know about acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 29, n. 3, p. 354, 2017.

RUIZ JÚNIOR, R. L.; CARVALHO, L. R. DE; CATANEO, A. J. M. Crescimento pulmonar compensatório (CPC): massa corpórea, conteúdo protéico e massa pulmonares em ratos subnutridos trilobectomizados. **Acta cirurgica brasileira**, v. 19, n. 2, p. 146–152, 2004.

SAMPAIO, R. S. **Síntese de derivados do ácido de Meldrum análogos aos salens/salofens e dos seus complexos de Mn para uso em catálise biomimética** – Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 2013, João Pessoa, Brasil.

SHAWISH, H. B. et al. **Nickel(II) complex of polyhydroxybenzaldehyde N4-thiosemicarbazone exhibits anti-inflammatory activity by inhibiting NF-κB transactivation.** *PloS one*, v. 9, n. 6, p. e100933, 2014.

SEVER, N. et al. Mechanism of lamellar body formation by lung surfactant protein B. **Molecular cell**, v. 81, n. 1, p. 49- 66.e8, 2021.

SWENSON KE, Swenson ER. Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury. **Crit Care Clin.** 2021 Oct;37(4):749-776. doi: 10.1016/j.ccc.2021.05.003. Epub 2021 May 28. PMID: 34548132; PMCID: PMC8162817.

SILVA, G. O. et al. Anti-inflammatory effect of quercetin in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury: a systematic review. *Concilium*, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 120-134, 31 jan. 2024. SUKI, B.; BATES, J. H. T. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 163, n. 1-3, p. 33-43, 2008.

SHAW, S.; White, J. D. Asymmetric Catalysis Using Chiral Salen–Metal Complexes: Recent Advances. *Chemical Reviews*, **2019**, 119(16), 9381-9426.

SWEENEY, R. M.; MCAULEY, D. F. Acute respiratory distress syndrome. **Lancet**, v. 388, n. 10058, p. 2416–2430, 2016.

TANG, J. et al. Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF-κB signaling pathway. **International immunopharmacology**, v. 91, n. 107272, p. 107272, 2021

THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 6, p. 562–572, 2017.

TRAN, H. M. et al. The impact of air pollution on respiratory diseases in an era of climate change: A review of the current evidence. **The Science of the total environment**, v. 898, p. 166340, 2023.

TYMKO, M. M. et al. Acid-base balance at high altitude in lowlanders and indigenous highlanders. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 132, n. 2, p. 575–580, 2022.

UTPAL, D. et al. Complexos baseados em Ru(ii), Ir(iii), Re(i) e Rh(iii) como metalofármacos anticâncer de próxima geração. **Dalton transactions** (Cambridge, Inglaterra: 2003) , v. 50, n. 32, p. 11259–11290, 2021.

VLAAR, A. P. J. et al. A consensus redefinition of transfusion-related acute lung injury. **Transfusion**, v. 59, n. 7, p. 2465–2476, 2019.

WALKEY, A. et al. Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. **Clinical epidemiology**, v. 4, p. 159, 2012.

YANG, S. C. et al. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. **Biomedical Journal**, v. 44, n. 4, p. 439-446, 2021.

YAN, J. et al. Molybdenum nanodots for acute lung injury therapy. **ACS nano**, v. 17, n. 23, p. 23872–23888, 2023.

YIN, M. et al. NIR triggered polydopamine coated cerium dioxide nanozyme for ameliorating acute lung injury via enhanced ROS scavenging. **Journal of nanobiotechnology**, v. 22, n. 1, p. 321, 2024

ZANATTO, Dennis Albert; MORI, Claudia Madalena Cabrera. **Plataforma BPEA: Boas Práticas em Experimentação Animal**, 2024. Disponível em: <https://sites.usp.br/bpeanimal/>. Acesso em: — de — de 2024

Zhang, Y., Wang, H., Yang, R., Zhang, Y., Chen, Y., Jiang, C., & Li, X. (2024). Efeitos terapêuticos sinérgicos de nanopartículas de polímero de coordenação D-manitol-cério-quercetina (rutina) em lesão pulmonar aguda. **Molecules** (Basel, Suíça) , 29 (12), 2819. <https://doi.org/10.3390/molecules29122819>

ANEXO I: PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA PARA UTILIZAÇÃO DOS ANIMAIS NA PESQUISA.



Universidade Federal da Paraíba
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ORAL COM METALOFÁRMACO Ni(II)-Mefen-VI NO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO", protocolada sob o CEUA nº 3458191124 (00-000276), sob a responsabilidade de **Adriano Francisco Alves** e equipe; João Pedro de Sousa Cândido - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/12/2024.

We certify that the proposal "Influence of Oral Treatment with the Metallo drug Ni(II)-Mefen-VI on the Experimental Development of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury", utilizing 40 Heterogenics mice (40 males), protocol number CEUA 3458191124 (00-000276), under the responsibility of **Adriano Francisco Alves** and team; João Pedro de Sousa Cândido - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 12/17/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2025 a 01/2025 Área: Fisiologia E Patologia

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarm

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 06 a 08 semanas Quantidade: 40

Linhagem: Mus musculus - Swiss

Peso: 35 a 40 g

João Pessoa, 17 de dezembro de 2024

Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares Moreira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



**ANEXO II: PROTOCOLO PARA A COLORAÇÃO EM HEMATOXILINA-EOSINA:
ADAPTADO DO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) DO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA EXPERIMENTAL DA UFPB.**

Procedimento:

1. Desparafinização em Xilol I por 5 minutos;
2. Desparafinização em Xilol II por 5 minutos;
3. Hidratação em álcool absoluto I por 5 minutos;
4. Hidratação em álcool absoluto II por 5 minutos;
5. Hidratação em álcool 90% por 5 minutos;
6. Hidratação em álcool 80% por 5 minutos;
7. Hidratação em álcool 70% por 5 minutos;
8. Lavar as lâminas em água corrente por 1 minuto;
9. Corar pela Hematoxilina por 1 minuto;
10. Lavar em água corrente branda por 10 minutos;
11. Mergulhar as lâminas em álcool 95% 10 vezes;
12. Corar pela Eosina por 5 minutos;
13. Mergulhar as lâminas em álcool 95% por 5 minutos;
14. Mergulhar as lâminas em álcool absoluto por 5 minutos;
15. Colocar as lâminas na estufa até secarem;
16. Montar a lâmina com resina acrílica e secar em temperatura ambiente.

