



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA

ÂNGELA CRISTINA BET

**Efeito de lipossomas de fosfatidilserina no processo inflamatório
em modelo de bolha de ar em camundongos**

Florianópolis

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA

ÂNGELA CRISTINA BET

**Efeito de lipossomas de fosfatidilserina no processo inflamatório
em modelo de bolha de ar em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, sob a orientação do Prof. Dr. Jamil Assreuy.

Florianópolis

2008

“Você perde 100% dos tiros que você nunca dá”

(Wayne Gretzky)

A minha mãe, pela vida, pelo amor e por ter sido o meu contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção de meus próprios valores.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jamil, pela confiança, orientação, dedicação e paciência. Sou muito grata não só pelo crescimento científico/profissional, mas também pelo crescimento pessoal.

À minha família, em especial a minha mãe, Dora, meu irmão, Adriano (meu exemplo), e meu pai, Osvaldo, pelo amor incondicional, por todo o suporte que disponibilizaram, sempre tentando entender minhas dificuldades e ausências, e que mesmo de longe se mostraram sempre preocupados e torcendo por mim.

Ao meu namorado, Sérgio, por seu amor, por sua paciência *quase* infinita e sua compreensão. Por me proporcionar momentos de leveza, me fazer rir e por não me deixar desistir.

Aos colegas de laboratório, Bettina, Letícia, Gustavo, Daniel, Regina, Geisson, Adriane, Simone e Edir, não somente pelo auxílio técnico e intelectual, como também pelo excelente convívio, pela paciência e pelos momentos de distração.

Quero expressar meu carinho especial a Bettina, que começou juntamente comigo este caminho, pela amizade, pelos ouvidos, conselhos e pelos importantíssimos "agora vai dar certo!"

À Letícia e Regina, pela amizade, pelo apoio e participação em importantes decisões.

Agradeço ainda ao Gustavo e Daniel pela colaboração na elaboração deste trabalho e pelo tempo disponibilizado, especialmente agradecendo ao Gustavo a sua imprescindível co-orientação.

A Prof.^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por ter permitido a minha entrada no meio científico através da iniciação científica.

AGRADECIMENTOS

Ao Jarbas, Sílvia e Mariana pela amizade, estímulo e apoio nas mais diversas situações.

Ao Prof. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos importantes para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela contribuição de uma forma ou de outra em minha formação científica.

Aos amigos fora do meio científico, Silvana, Andréia, Taiane, Diego, Érica, Andreza, Samira, Dani pelo alegre, carinhoso, prestável e gratificante relacionamento que construímos.

Ao apoio financeiro da Capes e CNPq.

SUMÁRIO

	Lista de Figuras.....	I
	Lista de Abreviaturas.....	III
	Resumo.....	V
	Abstract.....	VII
1	Introdução.....	1
1.1	Inflamação.....	1
1.2	Modelos de inflamação.....	3
1.3	Resolução da inflamação.....	4
1.4	Apoptose.....	6
1.5	Apoptose e Inflamação.....	8
1.6	Apoptose e Resolução da Inflamação.....	10
1.7	Interação fagócito/célula apoptótica.....	12
1.8	Mimetismo apoptótico como estratégia farmacológica.....	14
1.9	Heterogeneidade dos macrófagos.....	15
1.10	Justificativa.....	17

SUMÁRIO

2	Objetivos.....	18
3	Materiais e Métodos.....	19
3.1	Animais.....	19
3.2	Procedimentos experimentais.....	19
3.2.1	Modelo da bolha de ar (air-pouch) em camundongos.....	19
3.2.2	Contagem celular total.....	20
3.2.3	Contagem celular diferencial.....	20
3.2.4	Coloração dos esfregaços celulares.....	20
3.2.5	Concentração de proteínas.....	21
3.3	Preparação e tratamento com lipossomas de fosfatidilcolina (PC) ou fosfatidilserina (PS).....	21
3.3.1	Preparação dos lipossomas.....	21
3.3.2	Tratamentos.....	21
3.4	Obtenção do lavado peritoneal ('fator de transferência') e tratamentos.....	22
3.4.1	Obtenção do lavado.....	22
3.4.2	Tratamentos.....	22
3.5	Estudos relativos ao 'fator de transferência' obtido pelo tratamento com lipossomas.....	22
3.5.1	Análise da natureza do 'fator de transferência'	22
3.5.2	Análise da necessidade de síntese do 'fator de transferência'.....	23

3.5.3	Análise da possível origem celular do 'fator de transferência'.....	23
3.5.4	Análise da ação local do 'fator de transferência'	23
3.6	Compostos e reagentes.....	23
3.7	Análise estatística.....	24
4	Resultados.....	25
4.1	Caracterização do modelo.....	25
4.2	Efeito do tratamento com lipossomas de PS e PC no desenvolvimento do processo inflamatório no modelo bolha de ar (air-pouch).....	28
4.2.1	Dependência da dose, tempo e via de administração no efeito dos lipossomas de PS e PC.....	28
4.2.2	Efeitos dos lipossomas de PS e PC no número total de células e no perfil da migração celular na inflamação promovida por carragenina no modelo de bolha de ar.....	31
4.2.3	Efeito dos lipossomas de PS e PC na concentração de proteínas	
4.2.4	Efeito do tratamento intraperitoneal com lipossomas de PS e PC sobre o número de células peritoneais.....	33
4.3	Estudos do lavado peritoneal obtido após o tratamento com lipossomas.....	35
4.3.1	Verificação do efeito redutor de migração do lavado peritoneal na celularidade do processo inflamatório no modelo da bolha de ar..	35

4.3.2	Ensaio dose-resposta do efeito redutor de migração do lavado peritoneal gerado pelo tratamento com lipossomas de PS.....	37
4.4	Análise do 'fator de transferência'.....	38
4.4.1	Origem celular do 'fator de transferência' do lavado peritoneal gerado pelo tratamento com lipossomas de PS.....	38
4.4.2	Natureza química do 'fator de transferência' do lavado peritoneal gerado pelo tratamento com lipossomas de PS.....	39
4.4.3	Necessidade de síntese protéica para formação do 'fator de transferência' do lavado peritoneal obtido pelo tratamento com lipossomas de PS.....	43
4.4.4	Dependência da via de administração no efeito do 'fator de transferência' obtido pelo tratamento com lipossomas de PS.....	43
5	Discussão.....	44
5.1	Considerações Finais e Perspectivas.....	51
6	Referências Bibliográficas.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caracterização do modelo.....	26
Figura 2 - Curso temporal da celularidade diferencial no modelo de bolha de ar (<i>air-pouch</i>).....	27
Figura 3 - Curva dose-resposta do efeito do tratamento com lipossomas de PS e PC na migração celular.....	29
Figura 4 - Estudo da influência do tempo de administração de lipossomas de PS e PC (100 mg/kg), sobre o curso da resposta celular.....	30
Figura 5 - Dependência da via de administração nos efeitos anti-inflamatórios dos lipossomas de fosfatidilserina.....	31
Figura 6 - Estudo temporal do influxo de células encontradas no exudato da bolha em camundongos.....	32
Figura 7 - Efeito do tratamento com lipossomas de PS e PC sobre o acúmulo de proteínas na no modelo de bolha, em camundongos.....	33
Figura 8 - Número de células peritoneais de camundongos, após o tratamento com lipossomas PS ou PC.....	34
Figura 9 - Efeito do lavado peritoneal de camundongos injetados com lipossomas de PS ou de PC.....	36
Figura 10 - Influência do volume do lavado no efeito inibitório de migração no modelo da bolha.....	37
Figura 11 - Efeito do aumento do número de macrófagos na potência do 'fator de transferência'.....	39

Figura 12 - Análise da natureza do 'fator de transferência' gerado por PS no peritônio de camundongos.....	10
Figura 13 - Efeito da cicloheximida na ação redutora do 'fator de transferência' formado pela injeção de lipossoma de PS.....	42
Figura 14 - Dependência da via de administração para o efeito inibitório da migração celular causado pelo 'fator de transferência'.....	43

LISTA DE ABREVIações

15dPGJ2	15-desoxi-prostaglandina J ₂
ANOVA	Análise de variância
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CHX	Cicloheximida
COX-2	Ciclooxygenase-2
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Quinase ativada por estímulos extracelulares
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina – 1
IL-12	Interleucina – 12
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
KC	Quimiocinas de neutrófilos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK p38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito1
MIP-1 α	Proteína 1 macrofágica inflamatória
MIP-2	Proteína 2 macrofágica inflamatória
MN	Monócitos
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição nuclear

NOS-2	Óxido nítrico sintase - II
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Salina tamponada com fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PD-ECGF	Fator de crescimento para células endoteliais derivado de plaquetas
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polimorfonuclear
PPAR	Receptor ativador de proliferação de peroxissomos
PS	Fosfatidilserina
PSR	Receptor de fosfatidilserina
RANTES	Quimiocina secretada, expressa e regulada sob ativação de linfócitos T normais
SBTI	Inibidor de tripsina do feijão de soja
SC	Subcutânea
TGF- β	Fator transformador de crescimento- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Recentemente muita atenção tem sido dada à compreensão de mecanismos envolvidos não só na iniciação do processo inflamatório, mas também aos mecanismos envolvidos na manutenção/resolução deste processo. De maneira relevante, a apoptose vem sendo associada à resolução da inflamação, pois os sinais que promovem a apoptose são importantes para este processo. Além disso, a apoptose individualmente, também pode promover a resolução da inflamação. Já é bem caracterizada a expressão de fosfatidilserina na membrana de células apoptóticas. Os objetivos do presente trabalho foram estudar os efeitos da administração *in vivo* de lipossomas de fosfatidilserina (PS) na migração de células usando o modelo de inflamação induzido por carragenina na bolha de ar (*air pouch*) em camundongos. A administração de lipossomas de PS, mas não de fosfatidilcolina (PC) (10-100 mg/Kg, i.p., 8 horas após a carragenina) reduziu o influxo celular de maneira dose-dependente. Estas ações dos lipossomas de fosfatidilserina independem de interferência nas quimiocinas pró-inflamatórias iniciais, assim como são dependentes da via de administração utilizada. Este efeito não faz parte de um processo de contra-irritação. Camundongos 'receptores' tratados com lavado peritoneal obtido de animais 'doadores' que haviam recebido PS por via ip apresentaram um menor influxo celular total, dependente do volume do lavado utilizado. Além do mais, o aumento no número de macrófagos peritoneais com tioglicolato nos animais 'doadores', resultou em uma potencialização da ação do lavado. A natureza protéica do fator foi sugerida pela sua inativação pela fervura e por tripsina. O tratamento com cicloheximida diminuiu parcialmente a formação do 'fator', sugerindo que pelo menos parte do 'fator' é produzido e outra parte já está

pronta. Apenas o tratamento ip reduziu o influxo celular, não sendo observado nenhum efeito por outra via. Em conjunto, estes dados indicam que a injeção ip de lipossomas de PS induziu o aparecimento de um 'fator' que inibiu a migração celular induzida por carragenina na bolha de ar. Este fator é de natureza protéica, é liberado/sintetizado por macrófagos. Nossos resultados mostram que o mimetismo apoptótico pode mudar o curso de uma resposta inflamatória e que esta linha de pesquisa pode prover novas substâncias antiinflamatórias.

ABSTRACT

Recently much attention has been drawn to understanding the mechanisms involved not only in the initiation of the inflammatory process, but also how maintenance/resolution are operated. Apoptosis has been associated with the resolution of inflammation, since the signals that promote apoptosis are important to this process. Furthermore, apoptosis itself can promote the resolution of inflammation. Exposition of phosphatidylserine residues in the outer leaflet of plasma membrane is a well-characterized component of apoptosis. The objective of this study was to evaluate the effects of *in vivo* administration of phosphatidylserine (PS) liposomes on cell migration to air pouch stimulated with carrageenan in mice. Administration of PS, but not of phosphatidylcholine liposomes (PC; 10-100 mg/kg, ip) reduced the cell influx in a dose-dependent manner, even when administered 8 hours after the inflammatory stimulus. The effect of PS liposomes was independent of early pro-inflammatory chemokines, and was dependent on the route of administration used. Their effects were not part of a counter-irritation process. Mice treated with peritoneal wash fluid obtained from 'donor' animals which had received PS via ip previously, exhibited a significant reduction in cell influx, dependent of the volume of fluid used. Moreover, increasing peritoneal macrophage numbers in 'donors' animals with thioglycollate, resulted in an increased inhibitory effect on cell migration. The protein nature of the factor was suggested by its inactivation by boiling and trypsin. Cycloheximide treatment partly reduced the formation of the 'factor', suggesting that part of it is stored and part is produced upon stimulation. Injection of the 'factor' was effective only if performed via ip. Together, these data indicate that injection of PS liposomes induced the appearance of a 'factor' that inhibit cell migration induced by carrageenan in the air-pouch. This factor has a protein nature

and is released/synthesized by macrophages. Our results show that the apoptotic mimicry can change the course of an inflammatory response, and that this research line can provide new antiinflammatory compounds.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação aguda é caracterizada pela vasodilatação local que aumenta o fluxo sanguíneo na área inflamada e a permeabilidade microvascular, causando perda de fluido e proteínas plasmáticas para os tecidos. Concomitantemente, existe um aumento na expressão de moléculas de aderência celular e liberação de fatores quimiotáticos que facilitam a movimentação das células inflamatórias da circulação periférica ao local inflamado. Citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) ativam vias de sinalização em células endoteliais que regulam a expressão dessas moléculas de aderência para iniciar a 'captura' de leucócitos circulantes (SHANLEY; WARNER; WARD, 1995).

O recrutamento de leucócitos da circulação inicia-se pelo tráfego de polimorfonucleares granulócitos seguido por monócitos que, localmente, se diferenciam em macrófagos. Esta resposta normalmente envolve mastócitos e macrófagos teciduais residentes, cuja degranulação e ativação seqüencial liberam uma bateria de mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina e serotonina), citocinas, quimiocinas e também mediadores lipídicos que coletivamente recrutam e ativam as células inflamatórias, além de levarem à formação dos demais sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, inchaço, dor e perda da função do tecido (SHANLEY; WARNER; WARD, 1995).

Estes eventos fortemente regulados resultam em um predomínio de neutrófilos na área inflamada no início da lesão, que são depois gradualmente substituídos por células mononucleares - principalmente monócitos, que, em seguida, diferenciam-se em macrófagos. Estas células fagocitam material estranho e detritos celulares, liberam enzimas hidrolíticas e proteolíticas e geram espécies

reativas de oxigênio que eliminam e digerem organismos invasores. Quando segue seu curso normal, a resposta inflamatória encerra-se com a restauração da estrutura e função normal do tecido (LAWRENCE *et al.*, 2005).

Há muito tempo os mediadores químicos que causam os sinais cardinais da inflamação tem servido como base para o desenvolvimento e descoberta de fármacos anti-inflamatórios, como o desenvolvimento dos anti-inflamatórios não-esteroidais que começou em 1960 e segue até os mais recentes tempos, com os inibidores da ação do fator de necrose tumoral (TNF- α) (LARSEN; HENSON, 1983). Estes primeiros tempos da pesquisa da inflamação focada na elucidação de mediadores pró-inflamatórios deram vez à visão de que a inflamação é muito mais complexa e sofisticada do que inicialmente apreciado. Isto é ilustrado pela produção tanto de eicosanóides pró- como anti-inflamatórios que têm papéis importantes na orquestração da resposta inflamatória. Essa clara diversidade não é reservada aos mediadores lipídicos, mas estende-se às citocinas, quimiocinas e a expressão tanto de receptores ativadores como de inibidores nas células inflamatórias (LAWRENCE *et al.*, 2005).

Os mediadores e o mecanismo deste amplo e ignorado processo de resolução começaram a ser elucidados apenas recentemente. Tornou-se claro que mediadores anti-inflamatórios endógenos revertem mudanças vasculares e inibem a migração e ativação de leucócitos, e ao mesmo tempo promovem a segura remoção de células inflamatórias por apoptose e posterior fagocitose (LAWRENCE *et al.*, 2005).

1.2 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Esforços têm sido realizados no sentido de encontrar modelos experimentais e animais apropriados para cada tipo de reação inflamatória. Esta necessidade se deve ao fato que a maioria das reações inflamatórias apresentam características comuns, mas sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente. Protocolos experimentais, em que o processo inflamatório é induzido agudamente, têm sido utilizados para estudo da participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares e ainda possibilitam a seleção de fármacos com potencial atividade antiinflamatória. Entre os métodos para o estudo do processo inflamatório e para a seleção de novos fármacos, citam-se: pleurisia, bolha de ar, edema de pata, artrite e implantes subcutâneos de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985). No entanto, algumas técnicas apresentam limitações: dificuldades de manipulação durante a indução da inflamação e de quantificação dos parâmetros inflamatórios (edema, número e tipo de células envolvidas, extravasamento de proteínas, mediadores envolvidos).

O modelo da bolha de ar tem seus primeiros relatos em ratos na década de 60 (OKUDAIRA, SCHUWARZ, 1962) e em camundongos nos anos 70 (CLARK, 1975). Neste modelo, a partir do lavado da bolha de ar, é viável a avaliação do extravasamento de líquido, a migração de células bem como a de várias enzimas induzidas por diversos agentes flogísticos (DAWSON *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1994; POSADAS *et al.*, 2000). Neste modelo experimental os mediadores químicos são liberados também por células residentes ou por aquelas que migraram para o local da resposta inflamatória. Outros agentes flogísticos como a bradicinina, a histamina ou a substância P também são importantes agentes que participam da

resposta inflamatória promovendo aumento do número de leucócitos e/ou exsudação no local da lesão.

O modelo da bolha de ar possui vantagens em relação a outras técnicas já citadas anteriormente, pois a partir da coleta dos lavados da bolha de ar é possível analisar e quantificar diversos parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação, mediadores inflamatórios, sem a necessidade de recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem do modelo citado é a sua fácil execução.

1.3 RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

Inflamação aguda tem vários desfechos que incluem progressão para inflamação crônica, a formação de cicatrizes e fibrose ou a resolução completa (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999). A resolução foi definida em nível histológico/tecidual e foi considerada como um processo passivo através, por exemplo, da diminuição de estímulos quimiotáticos no local da inflamação. Com o isolamento de anti-inflamatórios endógenos, mediadores pró-resolutivos e suas caracterizações, tornou-se claro que a resolução é um processo ativo que envolve circuitos bioquímicos que sintetizam ativamente mediadores locais na fase de resolução, tais como as resolvinas (SERHAN, 1997; SERHAN et al., 2000; SERHAN, 2002). A fase de resolução surgiu como um terreno para a concepção de novos fármacos terapêuticos (GILROY, 2004). Por exemplo, uma pequena molécula de pró-resolvina pode, além de sua ação como agonista anti-inflamatório, promover a captura e a 'limpeza' de neutrófilos apoptóticos por macrófagos no sítio da inflamação (SERHAN, 2005).

Além disso, uma vez que muitos medicamentos utilizados atualmente foram desenvolvidos sem uma apreciação do seu potencial impacto na resolução, alguns agentes, como os amplamente utilizados inibidores da COX-2 provaram serem prejudiciais para a resolução do processo inflamatório (SERHAN, 2007), enquanto que outros podem possuir ações pró-resolutórias, tais como os glicocorticóides (ROSSI; SAWATZKY, 2007), inibidores de quinase dependente de ciclina (ROSSI *et al.*, 2006) e a aspirina (SERHAN, 2007).

Estudos sobre a produção de mediadores lipídicos ao longo das diferentes fases de um processo inflamatório têm apontado uma dinâmica interessante. Por um lado, observa-se uma produção majoritária de prostaglandina E₂ (PGE₂), a partir da atividade da enzima ciclooxigenase. A atividade desta enzima e a conseqüente produção de PGE₂ são importantes na geração das alterações vasculares de aporte sanguíneo local e na sensibilização de nociceptores. Além disso, outros mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico são importantes durante os momentos iniciais da inflamação, como é o caso do leucotrieno B₄, indispensável para tornar possível o tráfico de leucócitos do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial. Entretanto, ao longo do processo inflamatório, são observadas importantes alterações no metabolismo do ácido araquidônico, que têm como conseqüência a resolução da inflamação. Por exemplo, à medida que a inflamação prossegue, geralmente ocorre uma alteração na expressão das enzimas que participam do metabolismo do ácido araquidônico que passam a produzir, essencialmente, prostaglandina D₂, ao invés da E₂. A prostaglandina D₂ e seus derivados metabólicos, por sua vez participam de importantes processos relacionados com a liberação endógena de mediadores anti-inflamatórios, que por sua vez, atuam inibindo a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente,

durante o desenvolvimento da inflamação, a interação entre plaquetas e neutrófilos aderidos ao endotélio torna possível a produção de lipoxina A₄ e B₄, a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima lipooxigenase-5, ao invés da ciclooxigenase-2 (SERHAN; CHIANG, 2007). A 'troca' temporal da classe de mediadores lipídicos na família dos eicosanóides de pró a anti-inflamatórios, é um processo ativo que enfatiza a capacidade dos próprios leucócitos em acionar uma auto-limitação a resposta inflamatória aguda (LEVY, *et al.*, 2001).

Além desta seqüência pró e anti-inflamatória observada na produção de mediadores lipídicos, recentemente tem sido descrito melhor a importância na seqüência de migração de leucócitos. Como já se encontra bem estabelecido na literatura, a migração de leucócitos em especial de neutrófilos, é um evento importante no início da inflamação aguda. A presença destas células no tecido é importante na remoção de microorganismos patogênicos, mas a persistência destas células ativadas leva a degradação da matriz extracelular e promove danos ao hospedeiro. Em contrapartida, a remoção destas células por macrófagos que migram para o tecido em momentos mais tardios do processo inflamatório parece ser um evento importante na resolução da inflamação. Os mecanismos envolvidos neste processo parecem mediar a 'limpeza' das células inflamatórias, e o excesso de células do tecido residente que proliferaram em resposta ao processo reparador (SAVILL; FADOK, 2000).

1.4 APOPTOSE

A apoptose, ou (é um fenômeno de) morte celular programada, é reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto da necrose, há mais de 30 anos por Kerr e colaboradores (1972), que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma

célula não leva à morte de outras células. A morte celular por apoptose participa de várias situações fisiológicas tais como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfológicamente por condensação e fragmentação cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular (ISRAELS; ISRAELS, 1999). Fisiologicamente, a morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas.

De uma perspectiva bioquímica, em termos simples, é descrito que o processo de apoptose pode se dar, basicamente, através de duas vias distintas. A apoptose iniciada via receptores de morte tais como Fas, um membro da superfamília de receptores tipo fator de necrose tumoral (TNF) (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005) conhecida como via “extrínseca”. E a segunda via de apoptose conhecida como “intrínseca” ou mitocondrial que, quando estimulada, promove a liberação do citocromo c da mitocôndria e ativação de processos citoplasmáticos que resultam na morte celular. Todas estas vias convergem à ativação de uma cascata de proteases, as caspases, que clivam moléculas estruturais e regulatórias intracelulares como proteínas quinases, elementos do citoesqueleto, proteínas de reparo do DNA e ativam endonucleases. Com isso, as caspases afetam a estrutura do citoesqueleto, desregulam o ciclo celular, iniciam a degradação dos ácidos nucléicos (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005).

A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose, como desmontagem da membrana nuclear e do

arcabouço de lâminas, hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000).

Entretanto, em contraste com a enorme quantidade de informações e detalhes moleculares relacionados com a apoptose, pouco sabe-se sobre as conseqüências deste processo em um nível supra-celular, isto é, às conseqüências da interação de corpos apoptóticos com fagócitos e outras formas de interações celulares para a dinâmica de construção/reconstrução dos tecidos (SAVILL; FADOK, 2000).

1.5 APOPTOSE E INFLAMAÇÃO

No final do século XIX, foi descoberto que neutrófilos são retirados dos tecidos periféricos através da ingestão (fagocitose) feita por outra célula inflamatória, os macrófagos, cujo nome significa "grande célula que come" (FADOK, *et al.*, 1998). No entanto, durante muitos anos, foi assumido que os neutrófilos que entram no sítio de inflamação sofrem eventual "desintegração" ou necrose (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002). Além disso, mais tarde, foi descoberto que culturas de neutrófilos isolados que foram "envelhecidas" por incubação durante várias horas tornam-se sensíveis à fagocitose por macrófagos (LENT, 2001). A partir de 1989, começou a ser compreendido que os acontecimentos relatados acima poderiam ser explicados pelo processo fisiológico espontâneo de morte programada - 'apoptose' (TAYLOR, *et al.*, 2000).

É a apoptose de neutrófilos, na verdade, que provoca o reconhecimento específico e sua depuração por macrófagos, um passo essencial para reduzir a inflamação (KAWAHITO, 2000). Além de 'limpar' neutrófilos mortos, o processo de fagocitose pode servir com duplo propósito por iniciar um sinal fundamental para o macrófago inflamatório (e talvez para a célula dendrítica fagocítica) começar o processo de saída do local inflamado para a mais próxima abertura da drenagem linfática, o habitual destino dos macrófagos (FADOK, *et al.*, 1998).

Alternativamente, a interação/captação de células apoptóticas também pode estimular macrófagos a liberar mediadores que suprimem a resposta inflamatória (KIM; ELKON; MA, 2004). Fortes evidências *in vitro* e *in vivo* apontam, em particular, a secreção da citocina antiinflamatória TGF- β , que pode suprimir sinais pró-inflamatórios dos receptores *Toll-like*. Embora o mecanismo molecular envolvido na ação supressiva do TGF- β permaneça mal compreendido, ele parece estar estreitamente ligado aos acontecimentos induzidos pelo contato das células apoptóticas com monócitos e/ou macrófagos (SERHAN; SAVILL, 2005).

A 'limpeza' dos leucócitos apoptóticos por macrófagos, além disso, pode ser reforçada por vários mediadores inflamatórios descritos anteriormente que, por sua vez, podem ser amplificados pela precoce interação com células apoptóticas. Essa melhoria tem sido formalmente demonstrada pela exposição prévia de macrófagos a citocinas que aumentam a sua capacidade em ingerir células apoptóticas. Com base nestes dados experimentais, portanto, poderia ser proposto que, uma vez sinalizada a apoptose de leucócitos e células residente (um evento precoce), a posterior captação de células apoptóticas causa uma mudança no fenótipo do macrófago de ativado ou prejudicial para reparador ou migratório (SERHAN; SAVILL, 2005)

1.6 APOPTOSE E RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

A noção de apoptose como um evento ativo na dinâmica dos diversos tecidos, vem sendo associada a uma área de interesse crescente no estudo da inflamação, a resolução da inflamação (SERHAN; SAVILL, 2005). O acúmulo e a persistência de leucócitos nos tecidos é uma característica marcante da inflamação crônica. A apoptose e a 'limpeza' das células apoptóticas são reconhecidos como mecanismos de resolução da inflamação *in vivo* (HASLETT, 1999).

A apoptose dos polimorfonucleares e sua posterior fagocitose por macrófagos permitem a 'limpeza' das células mortas nos sítios inflamatórios. Estudos de Fadok e colaboradores (2001) demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas realizada por macrófagos promove a liberação de citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10 que suprimem a atividade pró-inflamatória dos mesmos. Estes estudos *in vitro* foram estendidos a modelos de inflamação *in vivo*. A transferência de células apoptóticas para pulmões estimulados com LPS reduziu a liberação de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de leucócitos; este efeito foi revertido pela administração do anti-soro neutralizante de TGF- β (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002). Além disso, a captação de células apoptóticas pelos macrófagos sinoviais mostrou melhorar a artrite induzida em camundongos (LENT, 2001).

Foi demonstrado que TGF- β impede a produção de citocinas pró-inflamatórias ao inibir a fosforilação da MAPK p38 e a ativação do NF- κ B (XIAO; MALCOLM; WORTHEN, 2002). Assim, um dos principais papéis no modelo de regulação da resposta inflamatória foi atribuído a liberação inicial de TGF- β (FADOK, et al., 1998). Do mesmo modo, foi demonstrado que a interação células apoptóticas/fagócitos é suficiente para inibir profundamente a produção da citocina inflamatória IL-12 por

macrófagos ativados, fazendo com que mudem de um estado pró-inflamatório a um anti-inflamatório (KIM; ELKON; MAX, 2004).

Além do mais, propõe-se que defeitos intrínsecos na apoptose e na 'limpeza' de células apoptóticas pode dar origem a doenças inflamatórias crônicas. Apoiando-se nesta hipótese, foi demonstrado a supressão da apoptose mediada por citocinas em escarro de pacientes com doenças pulmonares neutrofílicas, inclusive a fibrose cística, fibrose idiopática e pneumonia (TAYLOR, 2000). Um estudo recente, também descreveu uma diminuição da fagocitose de células apoptóticas em pacientes com fibrose cística e bronquite. Além disso, a diminuição da fagocitose tem sido associada a patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (SAVILL, *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos indicam que metabólitos endógenos da PGD₂ (como a 15dPGJ₂) poderiam regular a apoptose dos leucócitos durante a resolução da inflamação *in vivo*. Isto pode explicar as propriedades antiinflamatórias destes metabólitos das prostaglandinas. Os sinais que promovem a apoptose leucocitária são importantes para a resolução de inflamação; porém, a apoptose, individualmente, também pode promover a resolução da inflamação (SAVILL, *et al.*, 2002). Desta forma, é concebível admitir que vários mecanismos contribuem para a indução de atividades antiinflamatórias derivadas da interação entre células apoptóticas e os fagócitos.

1.7 INTERAÇÃO FAGÓCITO/CÉLULA APOPTÓTICA

Uma das características mais importantes do processo de apoptose é a interação e posterior remoção das células apoptóticas ou de seus resíduos por fagócitos. O reconhecimento de células apoptóticas não é feito só por macrófagos, mas também por células vizinhas do tecido, conhecidas como 'fagócitos não-profissionais'. Devido à importância do evento de reconhecimento/remoção de células apoptóticas, muitos esforços visando uma melhor compreensão dos mecanismos operativos deste evento vêm sendo recentemente despendidos nesse campo e muitos receptores e moléculas envolvidas nesse processo foram descritas nos últimos anos.

O reconhecimento das células apoptóticas envolve uma complexa seqüência molecular. As células apoptóticas sinalizam que entraram em processo de morte programada através da exibição de padrões moleculares específicos. Um destes padrões é a exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície de células apoptóticas, uma característica que foi primeiramente descrita na apoptose de linfócitos e posteriormente foi vista como um evento essencial na apoptose de qualquer célula de mamífero (HENSON; HUME, 2006). Normalmente, os resíduos de PS ficam no folheto interior da membrana e sua exposição no folheto externo é um dos primeiros eventos que se passa na superfície de uma célula em processo de apoptose, e já começa a ocorrer apenas 5 minutos após a indução de apoptose por estresse oxidativo com H₂O₂ (MOURDJEVA et al., 2005). Brevemente, este processo parece envolver modificações na atividade de duas enzimas: (a) a ativação da enzima fosfolípido scramblase, que aumenta o movimento bidirecional de lipídeos através da dupla camada da membrana, um movimento conhecido como *flip-flop* e (b) a inativação da enzima aminofosfolípido translocase, que retornaria a PS para a

camada interna da membrana citoplasmática. Estas alterações enzimáticas irreversíveis parecem estar relacionadas com a atividade da enzima caspase-3 (HENSON; HUME, 2006). A exposição de PS parece ser um evento crítico para o reconhecimento/remoção de células apoptóticas por macrófagos. Apesar de muitos outros receptores participarem deste processo, na ausência de PS a fagocitose de células apoptóticas é mínima. Adicionalmente, a seletividade e a estereoespecificidade deste processo de reconhecimento indicava o envolvimento de um receptor protéico na membrana de fagócitos. Este receptor de PS (PSR) foi logo descrito, clonado e estudado. Surpreendentemente, encontrou-se uma ampla distribuição deste receptor que inclui praticamente todas as células de mamíferos. Este achado ajuda a explicar o fato de que a maioria das células é capaz de realizar a remoção de células apoptóticas, independentemente da presença dos fagócitos profissionais. A ativação do PSR por si promove a macropinocitose em macrófagos, o que explica a importância desta sinalização para fagocitose de células apoptóticas (FADOK, 2001; HENSON; HUME, 2006).

Outra classe de modificação de superfície em uma célula apoptótica que sinaliza sua remoção é a alteração nos carboidratos de membrana. Alterações de carga na superfície de células apoptóticas são comuns e correlacionam-se com a formação de conglomerados de carboidratos, mas até o presente, nenhuma especificidade foi descrita. Em contrapartida, há algumas evidências que demonstram o aumento da exposição da manose, e que esta exposição facilita a remoção destas células. Além destas modificações citadas, há uma série de outros receptores expressos na membrana de fagócitos que estão envolvidos no processo de fagocitose de células apoptóticas, incluindo receptores *scavengers*, receptores de LDL oxidada, CD14, a integrina $\alpha_v\beta_3$ e a glicoproteína 1, embora estas moléculas

tenham sido pouco estudadas neste contexto até o momento (para revisão, ver HENSON; HUME, 2006).

1.8 MIMETISMO APOPTÓTICO COMO ESTRATÉGIA FARMACOLÓGICA

Com base no exposto anteriormente, a fosfatidilserina tem sido colocada como uma molécula central, senão obrigatória, na interação entre fagócitos e corpos apoptóticos (FADOK *et al.*, 2000; FADOK *et al.*, 2001). Neste contexto, Huynh e colaboradores (2001) exploraram se a PS poderia mimetizar os efeitos supressivos sobre a ativação de macrófagos que as células apoptóticas apresentavam. Neste trabalho pioneiro foi demonstrado que lipossomas contendo PS são capazes de mimetizar diversos efeitos de células apoptóticas, tais como a inibição da produção de TNF- α e a indução da expressão de TGF- β (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002).

Na seqüência, este mesmo grupo seguiu com o estudo de alguns efeitos de lipossomas de PS sobre a atividade de macrófagos *in vitro*, e mais recentemente sobre algumas funções do sistema imune *in vivo*. Os autores demonstraram que enquanto uma célula apoptótica desencadeava a expressão de TGF- β , células apoptóticas opsonizadas, ou células apoptóticas que não expressavam PS durante o processo de apoptose falharam em induzir a expressão de TGF- β por macrófagos. Além disso, Huynh e colaboradores, (2002) também demonstraram que lipossomas de PS, ou a própria PS diretamente transferidas para a superfície da membrana de células normais, eram suficientes para promover a expressão de TGF- β e outros componentes anti-inflamatórios em macrófagos. Esses trabalhos recentes do grupo de Henson também ajudam a explicar alguns achados mais antigos do grupo de Aramaki, que trabalhou com os efeitos de lipossomas de diferentes constituições lipídicas sobre a atividade de macrófagos. Antes do conhecimento do caráter anti-

inflamatório de células apoptóticas e antes de se compreender a biologia da PS durante estes efeitos, Aramaki e colaboradores (1996) observaram que lipossomas compostos de fosfolipídeos aniônicos, tais como PS e ácido fosfatídico, inibiam a expressão da enzima NOS-2 em macrófagos ativados com LPS.

Com estes dados experimentais, ficou bem estabelecido na literatura que as conseqüências da interação entre lipossomas de fosfatidilserina e macrófagos são muito semelhantes às conseqüências da interação entre células apoptóticas/macrófagos (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002; HOFFMAN *et al.*, 2005), tais como a inibição da expressão de TNF-alfa e NOS-2 (ARAMAKI, 2000), bem como o aumento da produção de TGF- β 1 (FADOK *et al.*, 1998; HUYNH; FADOK; HENSON, 2002).

1.9 HETEROGENEIDADE DOS MACRÓFAGOS

Monócitos circulantes podem dar origem a uma variedade de tipos de macrófagos residentes em tecidos de todo o corpo, bem como a células especializadas, como células dendríticas (DCs) e osteoclastos. Monócitos originam-se na medula óssea, e, em seguida, são liberados no sangue periférico, por onde circulam durante vários dias antes de entrarem nos tecidos e diferenciarem-se na população de macrófagos residentes (GORDON, 1986).

Estudos do sistema mononuclear fagocitário, utilizando anticorpos monoclonais específicos para diferentes receptores da superfície celular e diferenciação de antígenos, mostraram que existe uma grande heterogeneidade de fenótipos, que provavelmente refletem a especialização individual das subpopulações de macrófagos em cada microambiente. Por exemplo, o papel dos osteoclastos na remodelação óssea; a expressão de receptores *scavengers* e de

reconhecimento de padrão por macrófagos alveolares, que estão envolvidos na captura de microorganismos, vírus e partículas ambientais nos pulmões; o posicionamento dos macrófagos no timo e os macrófagos presentes no baço, no centro de depuração dos linfócitos apoptóticos que são gerados durante a resposta imune (GORDON; TAYLOR, 2005).

O tubo digestivo é uma das mais ricas fontes de macrófagos no corpo, e o isolamento de macrófagos da lâmina própria pôs em evidência um fenótipo único de macrófagos que é caracterizado pela alta atividade fagocítica e bactericida, mas fraca produção de citocinas pró-inflamatórias. Este fenótipo pode ser induzido em macrófagos derivados do sangue periférico por produtos de células do estroma intestinal, o que indica que o microambiente do tecido pode influenciar significativamente o fenótipo do macrófago residente (GORDON; TAYLOR, 2005).

Esta diferença pode refletir na resposta da interação entre células apoptóticas e fagócitos. Fadok e colaboradores (1992), compararam os diferentes mecanismos envolvidos no reconhecimento de células apoptóticas em diferentes sub-populações de macrófagos residentes. Os autores demonstraram que macrófagos peritoneais realizam a fagocitose através da interação com a PS, enquanto que macrófagos da medula óssea utilizam receptores de vitronectina e integrinas $\alpha_v\beta_3$. Um segundo exemplo é um estudo mostrando que macrófagos advindos de diferentes regiões anatômicas (baço e peritônio) demonstram diferenças com relação a expressão de receptores, bem como capacidade fagocítica (macrófagos peritoneais apresentaram maior atividade) e produção de NO e IFN- γ , além do estímulo imunogênico na proliferação de células T (macrófagos do baço apresentaram maior produção) (LIU; *et al*, 2006). Assim, o mecanismo de reconhecimento de células apoptóticas pode ser determinado pela subpopulação de macrófagos estudada, o que pode interferir

nas respostas e atividades antiinflamatórias derivadas da interação entre células apoptóticas e o fagócito.

1.10 JUSTIFICATIVA

Apenas alguns trabalhos exploraram a importância e mecanismos da interação/fagocitose de células apoptóticas *in vivo*, como Ramos e colaboradores (2007), que demonstraram a atividade antiinflamatória dependente de PPAR de lipossomas de fosfatidilserina na resolução da fase tardia do edema de pata promovido por carragenina em camundongos. Entretanto, devido ao modelo utilizado, houve pouco aprofundamento em relação à influência dos lipossomas de PS na migração celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

Estudar a influência dos lipossomas de fosfatidilserina no processo inflamatório induzido por carragenina em modelo de bolha de ar em camundongos.

2.2 Objetivos específicos:

- Estudar o efeito dos lipossomas de fosfatidilserina na migração celular induzida por carragenina no exsudato da bolha de ar;

- Analisar os tipos celulares presentes no exsudato e a influência dos lipossomas de PS nos mesmos;

- Avaliar a possível formação de um 'fator de transferência' com ação inibitória na migração celular;

- Investigar a participação dos macrófagos, natureza e formação dos possíveis mediadores liberados nos efeitos anti-inflamatórios dos lipossomas de PS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas e machos, com idade entre 3 a 4 meses (30-40 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12hs) controlados, com livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de Animais da UFSC (Protocolo PP003/CEUA) e estão de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH; USA).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Modelo da bolha de ar (air-pouch) em camundongos

Este modelo consiste da formação de uma cavidade artificial no dorso dos animais a partir da injeção subcutânea de ar estéril. Neste estudo seguiu-se o procedimento descrito por Ribeiro e colaboradores (1991). Inicialmente, injetou-se 5 ml de ar em animais sedados com tribromoetanol (estoque 2,5% em PBS; 125 mg/kg, IP) e, após três dias, a cavidade é mantida com a injeção de mais 3 mL de ar. No sétimo dia, injetou-se o agente flogístico de interesse, no presente estudo 500 μl de carragenina (Sigma, Lambda - Tipo IV) a 1% diluída em PBS estéril. Os animais controles receberam 500 μL de PBS. Em diferentes tempos após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados com hidrato de cloral (estoque 30% em PBS; 3750 mg/kg), fixados em mesa cirúrgica e as bolsas de ar abertas e lavadas, com auxílio de uma pipeta automática, com 1 mL de PBS estéril tamponado (pH 7,4)

e heparinizado (10 UI/ml). O lavado foi aliquotado em microtubos, em diluições variadas, para contagem global e diferencial das células presentes no exsudato e concentração protéica.

3.2.2 Contagem celular total

Para contagem global das células foi utilizada uma diluição de 1:20 dos conteúdos das bolha de ar, em solução de Türk (ácido acético 2%), utilizando-se de uma câmara de Neubauer e um microscópio ótico comum (aumento 100 vezes).

3.2.3 Contagem celular diferencial

Para contagem diferencial os lavados da bolha de ar foram diluídos 1:20 em PBS estéril heparinizado. Alíquotas de 60 µl foram utilizadas para a confecção dos esfregaços celulares em citocentrífuga (Cytospin®, model 7620, Wescor, Logan, Utah, EUA) e corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa (ver abaixo). A contagem celular diferencial (polimorfonucleares, mononucleares e mastócitos) foi realizada em microscópio ótico comum (aumento de 400 vezes), contando-se 100 células por lâmina.

3.2.4 Coloração dos esfregaços celulares

A metodologia consiste na coloração sucessiva de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald – 0,2 g diluídos em 100 ml de álcool metílico) e de azul-eosina (Giemsa – 0,3 g + 25 ml de glicerina diluídos em 25 ml de álcool metílico). As lâminas obtidas na citocentrífuga foram secas à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com May-Grünwald e deixadas por 2 minutos. A seguir adicionou-se água destilada nas lâminas ainda em presença do corante de May-Grünwald. Após 3 minutos, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com o corante Giemsa (diluído 1:20 em água destilada) por 15 minutos, seguido da lavagem das lâminas para posterior leitura.

3.2.5 Concentração de proteínas

Alíquotas do exsudato foram centrifugadas a 2000 g durante 15 minutos, o sobrenadante coletado foi armazenado a -20°C para posterior análise da concentração de proteína pelo método de Bradford. Este método é baseado na interação entre o corante “*Coomassie Brilliant Blue*” BG-250 e proteínas que contêm aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (BRADFORD, 1976).

3.3 Preparação e tratamento com lipossomas de fosfatidilcolina (PC) ou fosfatidilserina (PS)

3.3.1 Preparação dos lipossomas

Vesículas de lipossomas constituídas de fosfolipídeos foram preparadas de acordo com metodologia previamente descrita por Huynh e colaboradores, (2002), com pequenas alterações. Os fosfolipídeos foram dissolvidos em uma solução de clorofórmio/metanol (90:10), evaporados a vácuo e por fim ressuspensos em PBS e agitados em ultra-som (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, EUA) durante 40 minutos. Os fosfolipídeos usados neste trabalho foram constituídos de uma mistura de fosfatidilserina ou de fosfatidilcolina em pureza da ordem de 50%, sendo o restante constituído por outros fosfolipídeos.

3.3.2 Tratamentos

Lipossomas de PS ou PC foram administrados por via intraperitoneal ou diretamente na bolsa de ar em doses que variavam de 10 a 100 mg/kg. A maioria

dos tratamentos com lipossomas foi feita 8 horas após a injeção de carragenina, e em outros períodos, de acordo com o objetivo específico de cada experimento.

3.4 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL ('FATOR DE TRANSFERÊNCIA') E TRATAMENTOS

3.4.1 Obtenção do lavado

Em diferentes tempos após a aplicação intraperitoneal de PS, PC ou PBS (2, 8, ou 24 horas), camundongos 'doadores' (animais sem bolha de ar e sem injeção de carragenina) foram sacrificados por deslocamento cervical, em seguida foi injetado na cavidade peritoneal 1 ml de PBS estéril + heparina (10 UI/mL). Após leve massagem, procedeu-se à aspiração do lavado peritoneal. O material coletado individualmente foi separado em diferentes microtubos para realização das contagens global e diferencial (como descrito) e separação do sobrenadante, através de centrifugação a 2000 g por 15 minutos.

3.4.2 Tratamentos

Após a centrifugação, os sobrenadantes livres de células provenientes de diferentes animais 'doadores' foram misturados. Alíquotas deste *pool* foram administradas em animais 'receptores' seguindo o mesmo protocolo utilizado no tratamento com os lipossomas, e os volumes injetados foram 100, 250 e 500 µl.

3.5 ESTUDOS RELATIVOS AO 'FATOR DE TRANSFERÊNCIA' OBTIDO PELO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS

3.5.1 Análise da natureza do 'fator de transferência'

Para esta análise, o sobrenadante foi submetido à fervura durante 15 minutos ou à incubação com tripsina (25 µg/ml) a 37°C por 15 minutos. Para inativação da

tripsina após o término do período de incubação, adicionou-se SBTI (inibidor de tripsina do feijão de soja, 50 µg/ml). Como controle utilizou-se PBS fervido ou PBS + tripsina + SBTI (na mesma seqüência e concentrações utilizadas acima), de acordo com o ensaio. Alíquotas destas diversas combinações foram injetadas em animais 'receptores', como descrito acima.

3.5.2 Análise da necessidade de síntese do 'fator de transferência'

Para avaliar se o 'fator de transferência' é sintetizado ou se já existe estocado, animais 'doadores' foram tratados com cicloheximida (inibidor de síntese protéica, sc, 10 mg/Kg; Karuna *et al.*, 2007), 6 horas antes da administração da PS. Daí em diante, o procedimento foi idêntico como acima descrito.

3.5.3 Análise da possível origem celular do 'fator de transferência'

- Macrófagos

Na tentativa de elucidar a participação dos macrófagos na liberação do 'fator de transferência', foi administrado 1 ml de meio de tioglicolato (3%) ip em animais 'doadores', 4 dias antes da aplicação de PS ou PBS (utilizado como controle). A obtenção do lavado foi como anteriormente descrita.

- Análise da ação local do 'fator de transferência'

Para determinar se o fator teria ação se administrado por outra via, além da ação via intraperitoneal, o lavado foi administrado diretamente na bolsa de ar, previamente estimulada por carragenina, e também via intramuscular (IM).

3.6 Compostos e reagentes

Carragenina lambda tipo IV, SBTI, tioglicolato, tripsina, tribromoetanol, ciclohexemida foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaHPO₄, provenientes da Merck (São Paulo, SP, Brasil). Heparina sódica, gentilmente cedida por Cristália Produtos Farmacêuticos (São Paulo, SP, Brasil). Os fosfolipídeos foram adquiridos da Purifarma (Itália).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida, quando apropriado, pelo teste de Bonferroni (comparações com o grupo controle). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO

Inicialmente, procedeu-se a caracterização do modelo nas condições existentes em nosso laboratório. Esta caracterização foi realizada através da análise temporal do número total e diferencial das células encontradas no exsudato da cavidade artificial. Para esta análise animais receberam carragenina (500 μ l de solução 1%) diretamente na bolha de ar, o exsudato formado foi retirado e analisado em diferentes horários (8, 24, 48, 72 horas) quanto ao número total de células (Figura 1) e quanto à composição celular (Figura 2). Observou-se que as células encontradas em maior número no exsudato foram as polimorfonucleares, seguidas de mastócitos e de mononucleares. As células polimorfonucleares apresentam seu pico numérico 24 horas após a injeção de carragenina, reduzindo seus níveis em 48 e 72 horas. Já os mastócitos e as células mononucleares, apesar de terem um aumento pronunciado em 24 horas, tiveram seu pico de influxo em 72 horas (Figura 2 – Painel A). Além do mais, em 72 horas ocorre uma inversão na proporção da célula majoritariamente presente no exsudato, passando a ser os mastócitos e não mais células polimorfonucleares (Figura 2 - Painel B).

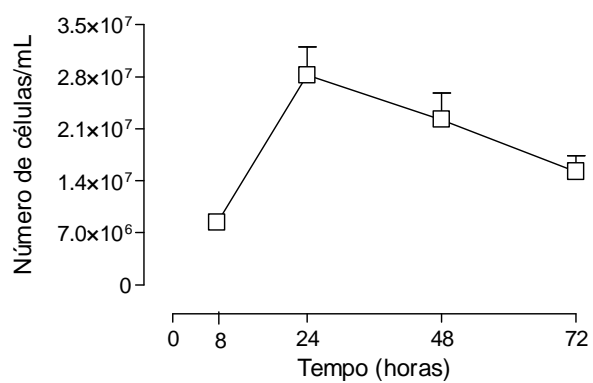


Figura 1: Curso temporal da celularidade no modelo bolha de ar (*air-pouch*) induzida por carragenina em camundongos.

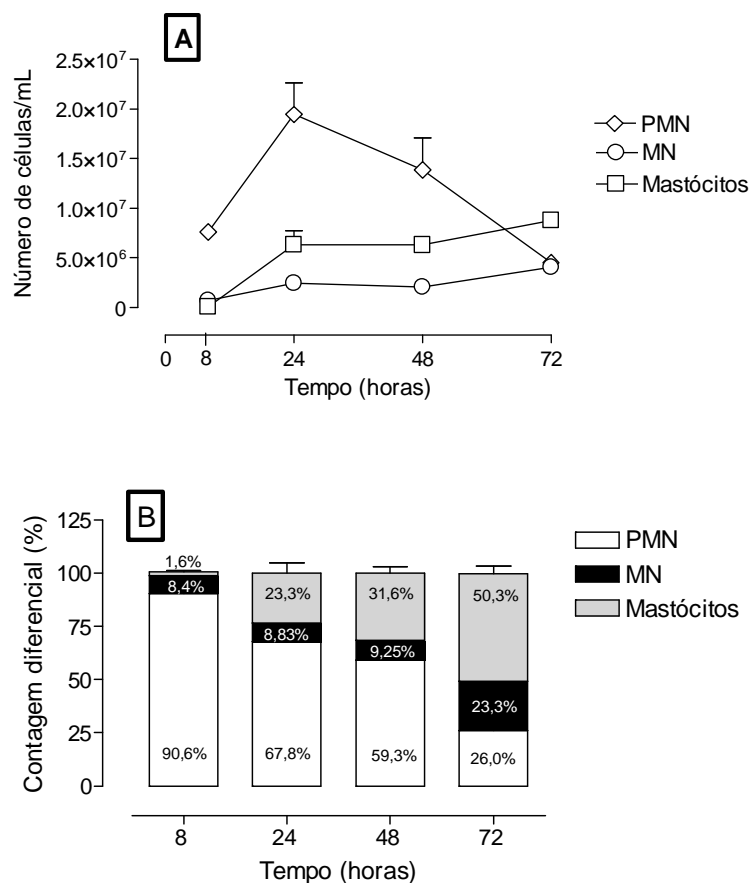


Figura 2: Curso temporal da celularidade diferencial no modelo de bolha de ar (*air-pouch*) induzida por carragenina em camundongos. **Painel A:** Curva temporal do perfil de células encontradas no exsudato da bolha após a administração de carragenina. **Painel B:** Percentual dos diferentes tipos de células encontradas no exsudato em diferentes tempos.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS DE PS E PC NO DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NO MODELO BOLHA DE AR (AIR-POUCH)

4.2.1 Dependência da dose, tempo e via de administração no efeito dos lipossomas de PS e PC

Na tentativa de melhor explorar o efeito anti-inflamatório dos lipossomas de PS no modelo, foi observado que a administração intraperitoneal de lipossomas de PS, mas não de PC, 8 horas após a injeção de carragenina, promoveu redução no influxo celular para a cavidade de maneira dependente da dose (Figura 3).

Em seguida foi estudada a influência da administração de lipossomas de PS em tempos diferentes sobre o curso da resposta celular. Observou-se que o efeito inibitório de uma única dose de lipossomas (100 mg/kg) foi igualmente efetiva se administrada em diferentes tempos após o estímulo inflamatório. A eficácia alcançada pelos tratamentos realizados, 4 ou 8 horas após, e concomitantemente com a injeção de carragenina, foram muito semelhantes (Figura 4).

Neste estudo também foi avaliada se havia diferenças nos efeitos produzidos pelos lipossomas de PS e a via de administração. Foi observado que a administração via intraperitoneal foi a única que produziu redução no influxo celular quando comparada com as outras vias testadas, intramuscular e diretamente no local da inflamação (Figura 5).

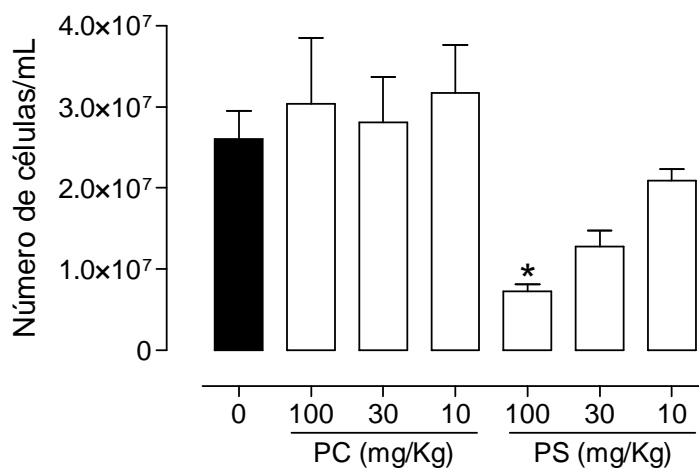


Figura 3: Curva dose-resposta do efeito do tratamento com lipossomas de PS e PC, ip, 8 horas após a carragenina, na migração celular no modelo de bolha de ar em camundongos. As contagens foram realizadas 24 horas após a administração de carragenina. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (barra cheia).

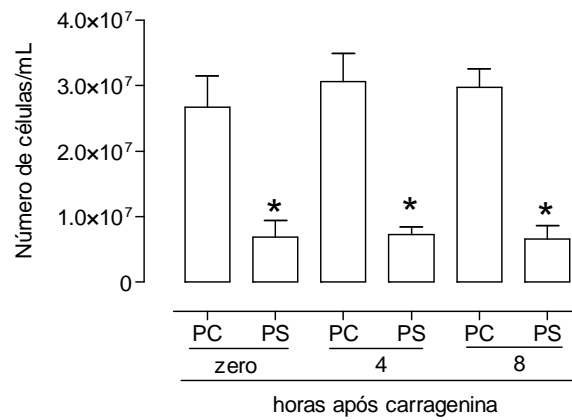


Figura 4: Estudo da influência do tempo de administração de lipossomas de PS e PC (100 mg/kg – ip – 0, 4, 8 horas após a carragenina), sobre o curso da resposta celular. Os dados referem-se à medida no tempo de 24 horas após a iniciação do processo inflamatório. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo PC de cada tempo.

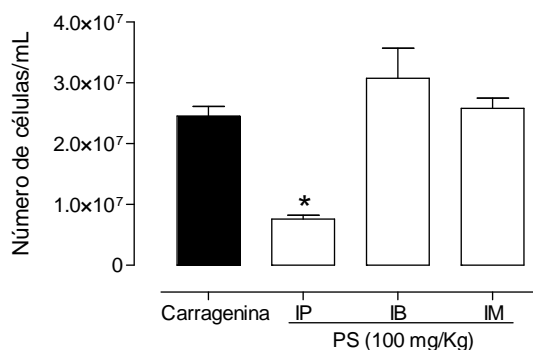
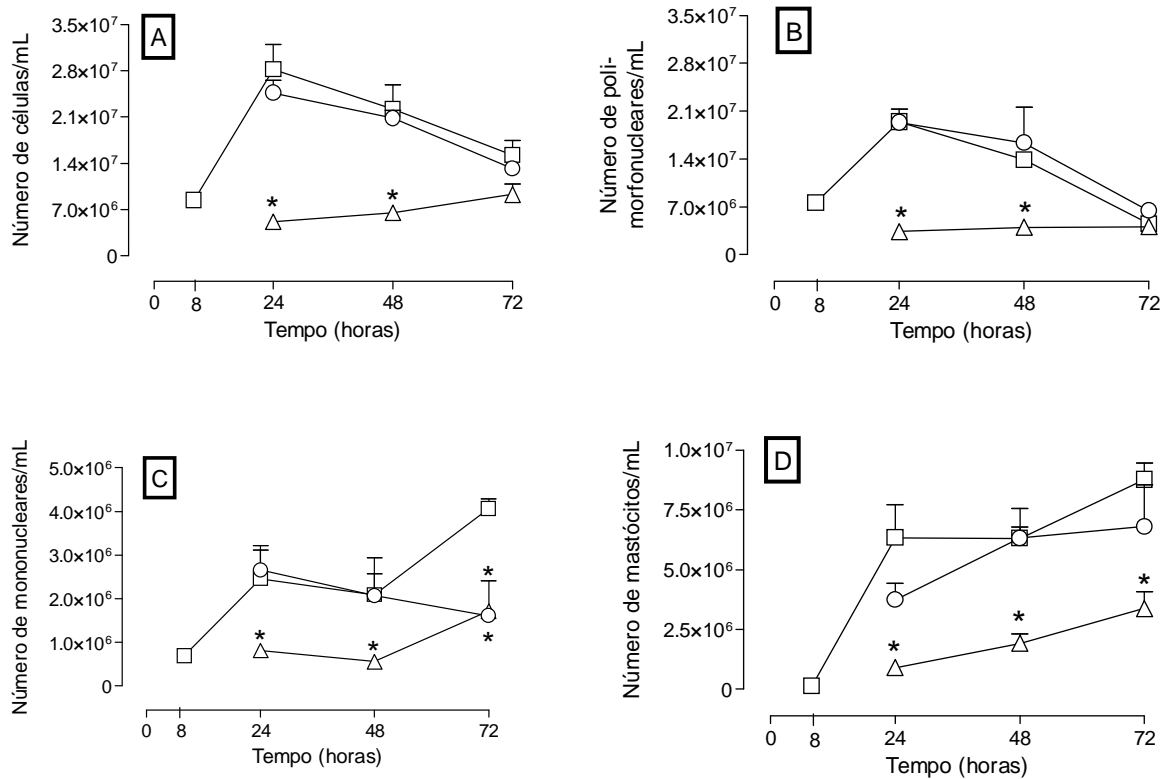


Figura 5: Dependência da via de administração nos efeitos anti-inflamatórios dos lipossomas de fosfatidilserina. A análise foi feita 24 horas após a iniciação do processo inflamatório. Tratamento com lipossomas de PS (100 mg/kg) via intraperitoneal (IP), diretamente na bolha (IB) e intramuscular (IM). Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (barra cheia).

4.2.2 Efeitos dos lipossomas de PS e PC no número total de células e no perfil da migração celular na inflamação promovida por carragenina no modelo de bolha de ar

Os animais tratados com PS (100 mg/kg) apresentaram menor influxo celular total, reflexo da diminuição do influxo dos três tipos celulares analisados (polimorfonucleares, mononucleares e mastócitos) (Figura 6 – Painéis A, B, C e D). Apesar de em 72 horas ter sido observado um aumento no número de mononucleares e mastócitos nos animais tratados com PS (Figura 6 – Painéis C e D), a quantidade encontrada foi menor que o controle. O influxo celular dos animais tratados com PC apresentou um padrão parecido com o encontrado nos animais controle, diferenciando-se apenas no que se refere ao número de monócitos no período de 72 horas (Figura 6 – Painel C).



□ Controle (PBS) ○ Fosfatidilcolina (PC) (100 mg/kg) △ Fosfatidilserina (PS) (100 mg/kg)

Figura 6: Estudo temporal do influxo de células encontradas no exsudato da bolha em camundongos. Animais que receberam carragenina, submetidos aos tratamentos com PS (triângulos), PC (círculos) (100 mg/kg) e como controle animais que receberam somente veículo (quadrados). Todos os tratamentos foram feitos 8 horas após a administração de carragenina. **Painel A:** Número total de células. **Painel B:** Número de células polimorfonucleares (PMN). **Painel C:** Número de células mononucleares (MN). **Painel D:** Número de mastócitos. Análise estatística: ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.2.3 Efeito dos lipossomas de PS e PC na concentração de proteínas

Uma vez observado que o tratamento com lipossomas de PS causou redução do número de células no exsudato, foi realizada a dosagem da concentração de proteínas 24 horas após a indução da inflamação por carragenina. Observou-se que o tratamento com lipossomas de PS (100 mg/kg), além de reduzir o número de células encontradas no exsudato também causou a redução nos níveis protéicos, o que não ocorreu com os animais que receberam tratamento com lipossomas de PC (100 mg/kg) (Figura 7).

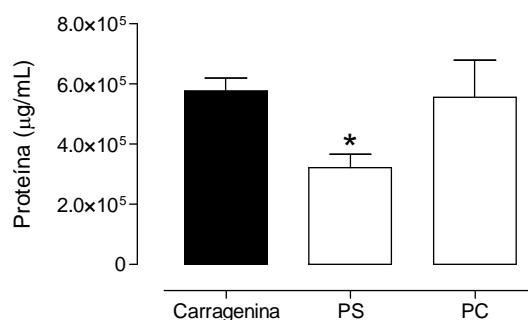


Figura 7: Efeito do tratamento com lipossomas de PS e PC sobre o acúmulo de proteínas no modelo de bolha, em camundongos. A dosagem foi feita 24 horas após a iniciação do processo inflamatório. Os lipossomas (100 mg/kg) foram injetados por via ip 8 horas após a aplicação de carragenina. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.2.4 Efeito do tratamento intraperitoneal com lipossomas de PS e PC sobre o número de células peritoneais

Os efeitos do tratamento com lipossomas de PS e PC também foram avaliados em relação ao número de células encontradas no lavado peritoneal. Encontrou-se que os tratamentos intraperitoneais com lipossomas de PS e PC não induziram aumento no número de células residentes no peritônio (Figura 8). Os dados foram coletados 8 horas após os tratamentos.

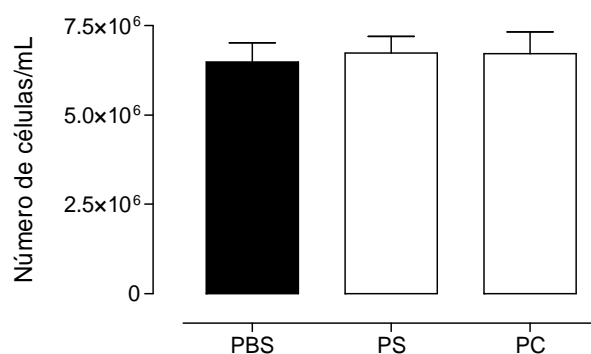


Figura 8: Número de células peritoneais de camundongos, após o tratamento com lipossomas PS ou PC (100 mg/kg, i.p.). Oito horas após a injeção de PS ou PC, os animais foram sacrificados, o peritônio foi lavado com 1 mL de PBS, seguido da aspiração do lavado, para posterior contagem em câmara de Neubauer.

4.3 ESTUDOS DO LAVADO PERITONEAL OBTIDO APÓS O TRATAMENTO COM LIPOSSOMAS

4.3.1 Verificação do efeito redutor de migração do lavado peritoneal na celularidade do processo inflamatório no modelo da bolha de ar

Neste ensaio foi observado que os animais 'receptores' tratados com lavado peritoneal obtido de animais 'doadores' que receberam PS por via ip, apresentaram um menor influxo celular total. O volume do lavado utilizado como tratamento foi de 500 μ L, referente ao volume total de lavado possível de ser aspirado do animal 'doador'. Este efeito inibitório não foi obtido quando os animais 'receptores' foram tratados com lavado obtido de animais 'doadores' que receberam PC, PBS ou que foram tratados com o sobrenadante de lipossomas de PS centrifugados (Figura 9). A migração para a bolha foi avaliada 24 horas após a iniciação do processo inflamatório pela carragenina.

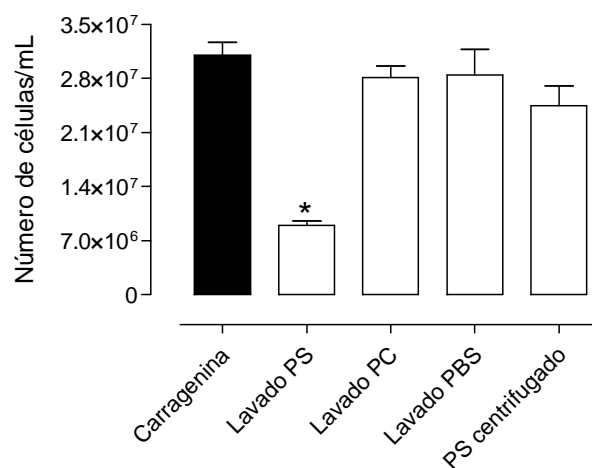


Figura 9: Efeito do lavado peritoneal de camundongos injetados com lipossomas de PS ou de PC. Animais 'doadores' (ver Materiais e Métodos) foram sacrificados 8 horas após receberem PS, PC (100 mg/kg) ou PBS. A cavidade peritoneal foi lavada com 1 mL de PBS, seguido da aspiração do lavado e sua centrifugação. Posteriormente os sobrenadantes livres de células provenientes de diferentes animais 'doadores' foram misturados. Alíquotas deste *pool* foram administradas em animais 'receptores' seguindo o mesmo protocolo utilizado no tratamento com os lipossomas, sendo o volume injetado de 500 μ L/animal. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.3.2 Ensaio dose-resposta do efeito redutor de migração do lavado peritoneal gerado pelo tratamento com lipossomas de PS

A injeção de volumes crescentes do lavado peritoneal obtido pelo tratamento com lipossomas de PS resultou em efeito volume-dependente. Animais 'receptores' que receberam 500 μL do lavado mostraram maior redução no número total de células, enquanto que os grupos que receberam volumes menores (250 ou 100 μL) não mostraram inibição da migração estatisticamente significativa (Figura 10).

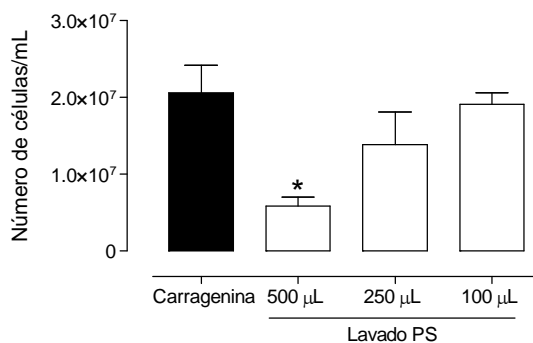


Figura 10: Influência do volume do lavado no efeito inibitório de migração no modelo da bolha. O protocolo experimental foi idêntico ao da Figura 9, variando-se apenas os volumes de lavado injetados nos animais 'receptores'. A contagem foi feita 24 horas após a injeção de carragenina. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.4 ANÁLISE DO 'FATOR DE TRANSFERÊNCIA'

Os dados até aqui obtidos indicam que a injeção ip de PS, mas não de PC, induziu o aparecimento de um 'fator de transferência' que inibiu a migração celular induzida por carragenina na bolha. Os próximos experimentos visaram, então, fazer uma caracterização química e farmacológica preliminar do 'fator de transferência' formado no peritônio.

4.4.1 Origem celular do 'fator de transferência' do lavado peritoneal gerado pelo tratamento com lipossomas de PS

Foi inicialmente analisado se o aumento do número de macrófagos peritoneais resultaria em um aumento na formação do 'fator de transferência'. Para isso, animais 'doadores' receberam tioglicolato quatro dias antes do tratamento com lipossomas de PS ou PBS (utilizado como controle). Após obtenção do sobrenadante do lavado, diferentes volumes foram utilizados no tratamento dos animais 'receptores' (100, 250 e 500 μ l). Observou-se que o grupo de animais 'receptores' que recebeu 100 μ l do sobrenadante obtido pela injeção de PS em cavidades previamente estimuladas com tioglicolato, já mostrou inibição significativa da migração. O mesmo perfil ocorreu com a injeção de volumes maiores (Figura 11).

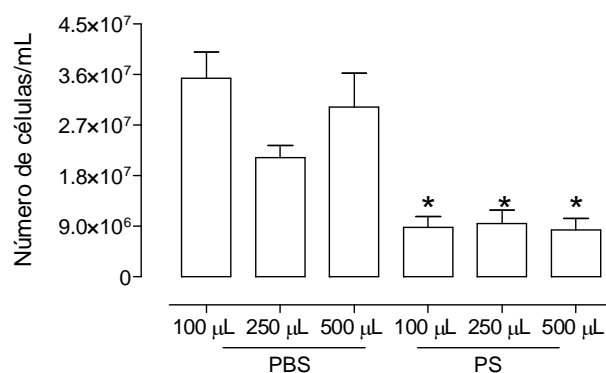


Figura 11: Efeito do aumento do número de macrófagos na potência do ‘fator de transferência’. Foi administrado 1 ml de meio de tioglicolato ip em animais ‘doadores’ 4 dias antes da aplicação de PS (100 mg/kg) ou PBS (utilizado como controle). A obtenção do lavado e o tratamento dos animais ‘receptores’ foram feitos como anteriormente descritos. A celularidade da bolha foi avaliada 24 horas após a injeção de carragenina. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle de mesmo volume de tratamento.

4.4.2 Natureza química do ‘fator de transferência’ do lavado peritoneal gerado pelo tratamento com lipossomas de PS

Para esta análise o *pool* dos lavados obtidos dos animais ‘doadores’ foi dividido em partes que foram submetidos a diferentes manipulações. Alíquotas de 500 μL do material submetido a estes testes foram utilizadas para o tratamento dos diferentes grupos de animais ‘receptores’. Neste ensaio foi observado que o efeito inibitório da migração celular na bolha foi perdido nos lavados submetidos à fervura ou à incubação com tripsina (Figura 12). Os controles utilizados – PBS + Tripsina + SBTI e PBS fervido – não apresentaram qualquer efeito.

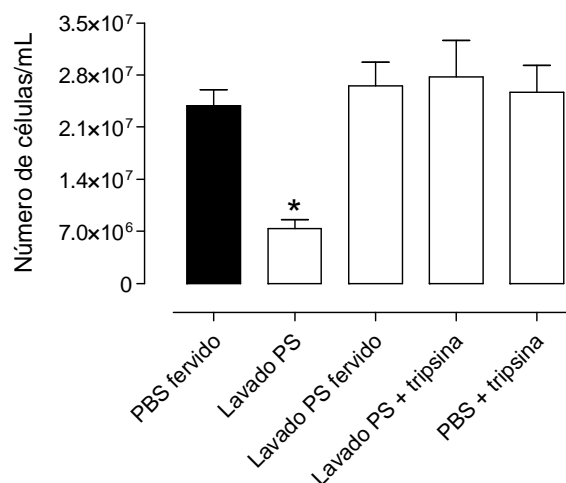


Figura 12: Análise da natureza do 'fator de transferência' gerado por PS no peritônio de camundongos. O sobrenadante retirado dos animais 'doadores' 8 horas após o tratamento com PS foi submetido à fervura durante 15 minutos ou à incubação com tripsina (25 µg/ml) a 37°C por 15 minutos. Para a inativação da tripsina, adicionou-se SBTI (50 µg/ml). Como controle utilizou-se PBS fervido ou PBS + tripsina + SBTI (na mesma seqüência e concentrações utilizadas). Aliquotas de 500 µl destas diversas combinações foram injetadas em animais 'receptores'. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS fervido).

4.4.3 Necessidade de síntese protéica para formação do ‘fator de transferência’ do lavado peritoneal obtido pelo tratamento com lipossomas de PS

Para avaliar se o ‘fator de transferência’ é sintetizado ou se já existe pré-formado, animais ‘doadores’ foram tratados com cicloheximida (10 mg/Kg), 6 horas antes da administração de lipossomas de PS. Como controles foram utilizados animais ‘doadores’ que receberam somente o veículo (etanol) e após 6 horas receberam a administração dos lipossomas de PS, e outro grupo de ‘doadores’ que receberam cicloheximida, mas que 6 horas após este tratamento receberam PBS. Neste ensaio foi possível observar que a cicloheximida diminuiu parcialmente a formação do ‘fator de transferência’, pois a ação do sobrenadante obtido dos animais ‘doadores’ que receberam cicloheximida e PS foi reduzida quase pela metade (Figura 13). O mesmo não ocorreu no tratamento com o sobrenadante dos ‘doadores’ que receberam somente veículo e PS. Além disso, também foi observado que o sobrenadante dos ‘doadores’ que receberam somente cicloheximida não interferiu no perfil inflamatório dos animais ‘receptores’.

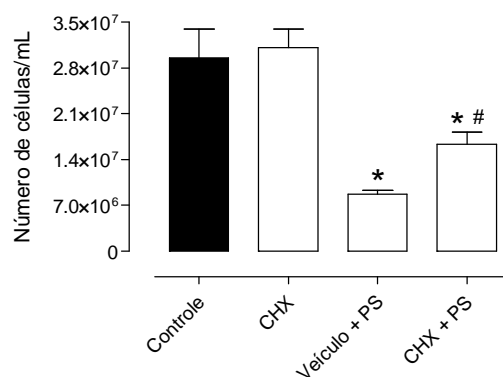


Figura 13: Efeito da cicloheximida na ação redutora do ‘fator de transferência’ formado pela injeção de lipossoma de PS. A celularidade foi avaliada 24 horas após a iniciação do processo inflamatório por carragenina nos animais ‘receptores’. Animais ‘doadores’ foram tratados com cicloheximida (CHX; 10 mg/Kg, sc) 6 horas antes da administração da PS. Oito horas depois, foi realizada a coleta do lavado, seguindo o mesmo procedimento descrito acima para obtenção do sobrenadante. Como controles foram utilizados animais ‘doadores’ que receberam veículo + PS, e animais ‘doadores’ que receberam apenas cicloheximida. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # indica $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

4.4.3 Dependência da via de administração no efeito do ‘fator de transferência’ obtido pelo tratamento com lipossomas de PS

Para determinar se o ‘fator de transferência’ teria ação se administrado por outra via que não a intraperitoneal, o fator foi administrado diretamente na bolsa de ar, previamente estimulada por carragenina, e também por via intramuscular, em diferentes grupos de animais ‘receptores’. Verificou-se que apenas o tratamento via intraperitoneal reduziu o influxo celular, não sendo observado nenhum efeito quando injetado por outra via (Figura 14).

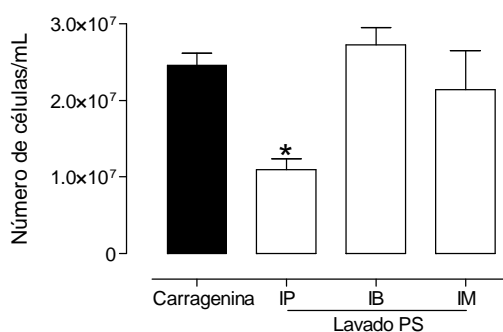


Figura 14: Dependência da via de administração para o efeito inibitório da migração celular causado pelo ‘fator de transferência’. A análise celular foi feita 24 horas após a iniciação do processo inflamatório por carragenina nos animais ‘receptores’. Os lavados foram injetados 8 horas após a administração da carragenina (500 µl/animal) por via intraperitoneal (IP), diretamente na bolha (IB) e por via intramuscular (IM). Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho procedeu-se, inicialmente, a caracterização do modelo de “bolha de ar dorsal” (*air pouch*). Como já mostrado em outros estudos, foi observado que, nas primeiras 24 horas, as células encontradas em maior número no exsudato foram polimorfonucleares, seguidas das mononucleares. Entretanto, também foi observado um grande influxo de mastócitos para o exsudato, sendo estas, as células encontradas majoritariamente em 72 horas. Apesar deste evento não ser bem descrito na literatura, existem alguns relatos demonstrando a presença destas células no modelo de inflamação utilizado, como Sin e colaboradores (1986) que demonstraram a presença de mastócitos no exsudato e nos tecidos adjacentes a cavidade formada pela bolha de ar, principalmente juntos aos capilares. Além do mais, outros estudos evidenciam a íntima associação entre o aumento do número de mastócitos e a angiogênese, o que pode explicar, em parte, o aumento do número de mastócitos, pois este evento estaria correlacionado a formação de novos vasos nos tecidos da cavidade formada. Fatores angiogênicos, como TGF- β , PAF, VEGF, bFGF e PD-ECGF, estariam envolvidos na quimiotaxia dos mastócitos (GRUBER; MARCHESE; KEW, 1995). Além do já exposto acima, a presença majoritária de mastócitos em períodos tardios analisados (72 horas) pode ser esclarecida por algumas evidências recentes, demonstrando a capacidade antiinflamatória destas células. Apesar de ainda não se saber o exato mecanismo pelo qual isto ocorre, alguns candidatos que podem estar envolvidos são a heparina, as quimases e as triptases (PUXEDDU; *et al*, 2005). De qualquer forma, o achado interessante no nosso estudo foi o fato de que há um grande número de mastócitos *no exsudato*, o que sugere que estas células estejam migrando ativamente para o sítio inflamatório.

Este aspecto demanda maior investigação, já que embora tenhamos procurado na literatura, não há trabalhos estudando as razões desta grande migração de mastócitos nem qual seu papel neste modelo de resposta inflamatória.

Após a caracterização do modelo, deu-se início ao estudo do efeito dos lipossomas de fosfatidilserina na inflamação induzida por carragenina no modelo de bolha de ar. Foi mostrado em modelo de edema de pata de camundongo (RAMOS *et al.*, 2007), que lipossomas de fosfatidilserina inibem o desenvolvimento do edema. Entretanto, não foi encontrado grande efeito na contagem de células inflamatórias. Como a migração celular é elemento fundamental na resposta inflamatória, optamos pelo estudo em um modelo onde a migração é um fenômeno central. Desta forma, optou-se por explorar a ação dos lipossomas de PS no modelo bolha de ar, na tentativa de entender quais suas ações sobre a migração de células inflamatórias.

Lipossomas de PS foram inicialmente propostos como uma estratégia de mimetismo apoptótico em um estudo pioneiro de Huynh e colaboradores (2002). Neste trabalho, estes autores demonstraram que enquanto células apoptóticas desencadeavam a expressão de TGF- β 1, células apoptóticas que não expressavam PS durante o processo de apoptose, falhavam em induzir a expressão de TGF- β 1 em macrófagos. Além disso, Huynh e colaboradores, (2002) também demonstraram que lipossomas de PS, ou a própria PS diretamente transferida para a superfície da membrana de células normais, eram suficientes para promover a expressão de TGF- β 1 e outros componentes anti-inflamatórios em macrófagos.

Neste contexto, ficou bem estabelecido na literatura que as conseqüências da interação entre lipossomas de PS e macrófagos são muito semelhantes às conseqüências da interação entre células apoptóticas e macrófagos (HOFFMAN *et al.*, 2005), tais como a inibição da expressão de TNF- α e NOS-2 (ARAMAKI, 2000),

bem como o aumento da produção de TGF- β 1 (FADOK *et al.*, 1998; HUYNH; FADOK; HENSON, 2002).

Com base no que foi exposto acima, observou-se que o tratamento com lipossomas de PS, mas não de PC, promoveu redução no influxo celular para a cavidade de maneira dependente da dose. Estes resultados são consistentes com a noção de que a sinalização que envolve a fosfatidilserina tem papel relevante na resolução da inflamação.

Além de explorar os efeitos do tratamento com lipossomas de fosfatidilserina de maneira dependente da dose administrada, no presente trabalho também foram explorados alguns aspectos relacionados com a cinética dos efeitos desse tratamento. Uma única administração (100 mg/kg), 8 horas após a indução do processo inflamatório, resultou numa redução da mesma eficácia alcançada pelos tratamentos realizados 4 horas após, ou concomitantemente com a indução da resposta inflamatória. Em conjunto, estes resultados sugerem que as ações antiinflamatórias dos lipossomas de PS independem de interferência nas quimiocinas pró-inflamatórias iniciais. Foi caracterizado por García-Ramallo e colaboradores (2002) que, no modelo de bolha de ar, os picos de síntese de mediadores pró-inflamatórios (KC, MIP-2, MIP-1 α , RANTES e TNF- α) ocorrem em até 6 horas após a administração da carragenina, sendo a MCP-1 a única em que a síntese é sustentada até 24 horas após a indução.

Neste estudo também foi avaliado se haviam diferenças entre as vias de administração dos lipossomas de PS (100 mg/kg) e os efeitos anti-inflamatórios produzidos. Foi observado que a administração via IP foi a única que produziu redução no influxo celular quando comparada com as outras vias testadas, a intramuscular e a diretamente no local da inflamação. Em dados não mostrados de

nosso laboratório, foi observado que o tratamento via SC também teve ausência de ação sobre o edema de pata induzido por carragenina. Esta diferença de efeito pode estar relacionada ao fato de que número de macrófagos residentes presentes no peritônio é muito maior que o número encontrado nos tecidos adjacentes a bolha ou no músculo do animal. Além disto, esta diferença também pode estar relacionada a heterogeneidade dos macrófagos residentes, já que, como comentado anteriormente (FADOK *et al.*, 1992), o mecanismo de reconhecimento de células apoptóticas pode ser determinado pela sub-população de macrófagos envolvida, o que pode interferir nas respostas e atividades antiinflamatórias derivadas da interação entre os lipossomas de PS e os macrófagos. Assim, os macrófagos peritoneais reconhecem células apoptóticas através da exposição da fosfatidilserina, o que pode não ocorrer com a subpopulação de macrófagos residentes em outros tecidos, sendo necessária a interação adicional com algum outro fator da membrana, ou outro diferente da fosfatidilserina. Vale ressaltar a falta de efeito dos lipossomas de PS quando aplicados diretamente na bolha, excluindo, assim, a possibilidade de uma ação detergente do mesmo.

A redução do influxo celular observado pelo tratamento via ip foi um reflexo da diminuição do influxo dos três tipos celulares analisados (polimorfonucleares, mononucleares e mastócitos). Apesar de em 72 horas ter sido observado um aumento no número de mononucleares e mastócitos nos animais tratados com PS, a quantidade encontrada foi menor que o controle. Ao menos em parte estes resultados podem ser explicados pela ação de redução na produção/liberação de IL-1 β pelos lipossomas de PS (RAMOS *et al.*, 2007). A IL-1 β é um importante mediador pró-inflamatório que participa na dinâmica da inflamação promovendo a expressão de moléculas de adesão, migração de leucócitos e aumento da permeabilidade

vascular (HALLEGUA; WEISMAN, 2002; DINARELLO, 1993). Este evento pode também estar correlacionado com os resultados obtidos na redução do extravasamento protéico apresentado pelo tratamento com lipossomas de PS. Portanto, a capacidade dos lipossomas de PS em reduzir o influxo do número de células e o extravasamento protéico estaria correlacionada com a redução na produção de IL-1 β . Nesta linha de evidência, Fadok e colaboradores (1998) demonstraram *in vitro* que macrófagos incubados com células apoptóticas apresentavam secreção diminuída de uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α , após estimulação com LPS. Neste mesmo trabalho, estes autores explicaram que essa inibição na secreção de citocinas pelo tratamento com células apoptóticas era dependente da formação e sinalização parácrina de TGF- β e PGE₂. Em outro estudo, Otsuka e colaboradores, (2004) demonstraram que o tratamento *in vitro* de macrófagos ativados com lipossomas aniônicos (como lipossomas de PS) promovia a diminuição na secreção de TNF- α por macrófagos ativados com LPS, e que esta ativação era dependente da ativação da cascata de quinases ERK.

Com intuito de limitar as interferências de um possível fenômeno de contra-irritação nos resultados obtidos, os efeitos do tratamento com lipossomas de PS e PC também foram avaliados em relação ao número de células encontradas no lavado peritoneal. Isto teve a finalidade de demonstrar que a aplicação intraperitoneal de lipossomas de PS não estaria causando um processo inflamatório que estaria diminuindo a inflamação induzida na bolha.

O fenômeno de contra-irritação é uma observação clínica comum. Entretanto, este fenômeno não foi cientificamente analisado a fundo até os últimos anos (SZOLCSÁNYI, *et al.*, 1998). Existem apenas algumas teorias que tentam

explicar o fenômeno propondo uma liberação local de mediadores anti-inflamatórios (WILLER; BOUHASSIRA; LE BARS, 1999). Em nosso trabalho, encontrou-se que o tratamento intraperitoneal com lipossomas de PS e PC não induziu aumento no número de células residentes no peritônio, o que pode sugerir a ausência de interferência de um fenômeno de contra-irritação nos resultados observados.

Tendo como base o trabalho de Aramaki, (2002) que demonstrou que após a interação com lipossomas de fosfatidilserina *in vitro*, macrófagos iniciam a expressão de TGF- β , explorou-se a possibilidade da capacidade antiinflamatória do lavado peritoneal centrifugado de animais 'doadores' que receberam lipossomas de PS. Neste ensaio foi observado que animais 'receptores' tratados com lavado peritoneal, obtido de animais 'doadores' que haviam recebido PS por via ip, apresentaram um menor influxo celular total e que esta resposta antiinflamatória era dependente do volume do lavado utilizado no tratamento. Este resultado indica que a injeção ip de PS induziu o aparecimento de um 'fator' que inibiu a migração celular induzida por carragenina na bolha. Além do mais, foi demonstrado que o aumento no número de macrófagos peritoneais nos animais 'doadores' resultou em uma potencialização da ação do lavado peritoneal. Em conjunto, estes resultados indicam que a interação entre os lipossomas de fosfatidilserina com os macrófagos está produzindo/liberando fatores anti-inflamatórios, e que esta produção/liberação é dependente do número de macrófagos que entram em contato com os lipossomas de PS.

Ao analisar a natureza química do 'fator' foi observado que o mesmo é degradado quando submetido a fervura ou a incubação com tripsina, apontando para a possível natureza protéica do(s) 'fator(es)' produzido/liberado(s). Estes resultados vão ao encontro aos estudos já descritos acima, pois ambos, TGF-beta e

IL-10, substâncias comprovadamente liberadas na interação entre lipossomas de PS e macrófagos, têm natureza protéica.

Além de explorar a natureza química do(s) fator(es), foi analisado se o(s) mesmo(s) estaria(m) sendo produzido(s) ou liberado(s). Foi observado que o tratamento com cicloheximida diminuiu parcialmente a formação da(s) proteína(s), levando a interpretação de que pelo menos parte das substâncias envolvidas nos efeitos anti-inflamatórios dos lipossomas de PS são produzidas após a interação lipossomas PS/macrófagos, enquanto que outra parte já esta pronta, sendo apenas liberada. Com este resultado, pode-se propor também que não seria apenas um mediador que estaria envolvido nas ações antiinflamatórias dos lipossomas, sendo até mais coerente sugerir, um *pool* de fatores, com diferentes atividades convergindo para um mesmo propósito, a resolução da inflamação.

Na tentativa de explicar onde estes fatores estariam atuando, foi avaliado se a administração do lavado, ou seja, do conjunto de proteínas produzidos e liberados pelos macrófagos teriam efeito se aplicados por outra via, ou no local da inflamação. Foi observado, novamente, que apenas o tratamento via ip reduziu o influxo celular, não sendo observado nenhum efeito quando injetado por outra via. A falta de efeito no tratamento via intramuscular pode ter explicação pela menor irrigação local, o que dificultaria a chegada dos 'fatores' aos seus sítios de ação. Já no caso do tratamento no local da inflamação, pode-se supor que o pH diminuído do exsudato (BROWN, 1981) poderia estar degradando os 'fatores'; ou que, simplesmente, devido ao processo de exsudação presente, os 'fatores' não consigam atingir a circulação não alcançando seus sítios de ação.

O efeito anti-inflamatório conseguido apenas pela administração intraperitoneal dos fatores produzidos na interação macrófago/lipossomas pode

estar relacionado a várias possibilidades, como: a) uma ação sistêmica, levando a redução da produção de novas células inflamatórias pela medula; b) os 'fatores' conseguirem seus efeitos apenas quando entram em grandes quantidades e rapidamente na circulação; ou c) fazer parte de uma rede de sinalizações que ainda não são atualmente conhecidas.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A resolução da inflamação deve ser vista como um processo ativo que não se deve somente a um simples cessar de estímulos inflamatórios. Recentemente muita atenção tem sido dada à compreensão de mecanismos envolvidos não só na iniciação do processo inflamatório, mas também nos mecanismos envolvidos na manutenção/resolução deste processo (SERHAN, 2004; SERHAN; SAVILL, 2005).

No presente trabalho, explorou-se a noção de que o mimetismo apoptótico, através de lipossomas de PS, pode modificar o curso da inflamação. Neste sentido, demonstrou-se que a administração destes lipossomas interfere no curso da inflamação induzida por carragenina em modelos de bolha de ar em camundongos. Adicionalmente, demonstrou-se que as ações dos lipossomas são dependente dos macrófagos e possivelmente da sub-população de macrófagos envolvida, embora esta afirmativa necessite de mais estudos. Também ficou demonstrado que os fatores protéicos produzidos/liberados por esta interação possuem ação que parece depender da quantidade/velocidade com que chegam à circulação, podendo também fazer parte de uma resposta sistêmica, abrangendo mediadores indiretos. Entretanto, muitos outros ensaios ainda têm de ser realizados a fim de estabelecer quais os possíveis mediadores envolvidos e quais os mecanismos estariam envolvidos nas ações anti-inflamatórias observadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAMAKY, Y.; NITTA, F.; MATSUNO, R.; MORIMURA, Y.; TSUCHIYA, S.. Inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 220, p. 1-6, 1996.

ARAMAKI Y.. Liposomes as immunomodulator--inhibitory effect of liposomes on NO production from macrophages. *Biol Pharm Bull.* v. (11), p. 1267-74, 2000.

ARNHOLD, J.. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry.* v. 69, n. 1, p. 4-9, 2004.

BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, R.D.. The failure of local anaesthesia in acute inflammation. Some recent concepts. *Br Dent J.* v. 151(2), p. 47-51, 1981.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.. Robbins Pathologic Basis of Disease. *WB Saunders: Philadelphia*, p. 1425, 1999.

DINARELLO, C.A.. Modalities for reducing interleukin 1 activity in disease. *Immunol Today.* v. 14, p. 260-264, 1993.

FADOK, V.A.; SAVILL, J.S.; HASLETT, C.; BRATTON, D.L.; DOHERTY, D.E.; CAMPBELL, P.A.; HENSON, P.M.. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.* v. 149(12), p. 4029-35, 1992.

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.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; ROSE, D.M.; PESRSON, A.; EZEKEWITZ, R.A.; HENSON, P.M.. Arecptor for phophatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* v. 405, p. 85-90, 2000.

FADOK, V.A.; CATHELINEAU, A.; DELEKE, D.L.; HENSON, P.M.; BRATTON, D.L.. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* v. 276, p. 1071-1077, 2001.

GARCÍA-RAMALLO, E.; MARQUES, T.; PRATS, N.; BELETA, J, KUNKEL, S.L.; GODESSART, N.. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol.* v. 169(11), p. 6467-73, 2002.

GHOBRAL, I.M.; WITZIG T.E.; ADJEI, A.A.. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Cancer J. Clin.* v.5, p 178-194, 2005.

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G.. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* v. 3, p. 401–416, 2004.

GORDON, S.. Biology of the macrophage. *J. Cell Sci.* v. 4, p. 267–286, 1986.

GORDON S.; TAYLOR P.R.. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* v. 12, p. 953-64, 2005.

GRUBER, B.L.; MARCHESE, M.J.; KEW R.. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood.* v.86(7), p. 2488-93, 1995.

HALLEGUA, D.S.; WEISMAN, M.H.. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann Rheum Dis.* v. 61, p. 960–967, 2002.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* v. 160, p. 5–11, 1999.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, p. 770-776, 2000.

HENSON, P.M.; HUME, D.A.. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* v. 27, p. 244–250, 2006.

HOFFMANN, P.R.; KENCH, J.A.; VONDRACEK, A.; KRUK, A.; DALEKE, D.L.; JORDAN, M.. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol.* v. 174, p. 1393–1404, 2005.

HUYNH, M.L.; FADOK, V.A.; HENSON, P.M.. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* v. 109, p. 41–50, 2002

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. *Stem Cells*, v. 17, p. 306-313, 1999.

KAWAHITO, Y.. 15-deoxy-12,14-PGJ2 induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Clin. Invest.* v. 106, p. 189–197, 2000.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIM, S.; ELKON, K.B.; MA, X.. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity.* v. 21, p. 643–653, 2004.

LARSEN, G.L.; HENSON, P.M.. Mediators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* v. 1, p. 335–359, 1983.

LAWRENCE, T.; BEBIEN, M.; LIU, G.Y.; NIZET, V.; KARIN, M.. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature.* v. 434, p.1138–1143, 2005.

LENT, P.L.. Uptake of apoptotic leucocytes by synovial lining macrophages inhibits immune complex-mediated arthritis. *J. Leukocyte Biol.* v. 70, p. 708–714, 2001.

LEVY, B.D.; CLISH, C.B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C.N.. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* v. 2, p. 612–619, 2001.

LIU, G.; XIA, X.; GONG, S.; ZHAO Y.. The macrophage heterogeneity: Difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80⁺ macrophages. *J. Cell. Physiol.* v. 209, p. 341-352, 2006.

MOURDJEVA, M.; KYURKCHIEV, D.; MANDINOVA, A.; ALTANKOVA, I.; KEHAYOV, I.; KYURKCHIEV S.. Dynamic of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detect by monoclonal antibody. *Apoptosis.* v. 10, p. 209-217, 2005.

OTSUKA, M.; TSUCHIYA, S.; ARAMAKI, Y.. Involvement of ERK, a MAP kinase, in the production of TGF- β by macrophages treat with liposomes composed of phosphatidylserine. *Biochim Biophys Res Commun.* V 324, p. 1400-1405, 2004.

PUXEDDU, I.; RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; LEVI-SCHAFFER, F.. Mast cells and eosinophils: A novel link between inflammation and angiogenesis in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* v. 116, p.531-6, 2005.

RAMOS, G.C.; FERNANDES, D., CHARAO, C.T.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; ASSREUY, J.. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in vivo. *Br J Pharmacol.* v. 151(6), p. 844-50, 2007.

RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunol.* v. 73, p. 472-7, 1991.

ROSSI, A.G.; SAWATZKY, D.A.; WALKER, A., WARD, C.; SHELDRAKE, T.A.; RILEY, N.A.. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med.* v. 12, p. 1056–1064, 2006.

ROSSI, A.G.; SAWATZKY, D.A.. The resolution of inflammation. *Inflammation Research.* Progress in Basel, 2007.

SAVILL, J.; FADOK, V.A.. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. v. 407, p. 784–788, 2000.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C.. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immuneresponses. *Nat Rev Immunol*. v. 2, p. 965–975, 2002.

SERHAN, C.N.. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epilipoxins (ATL): a jungle of cell–cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins*. v. 53, p. 107–137, 1997.

SERHAN, C.N.; CLISH, C.B.; BRANNON, J.; COLGAN, S.P.; CHIANG, N., GRONERT, K.. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*. v. 192, p. 1197–1204, 2000.

SERHAN, C.N.. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and proresolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. v. 68-69, p. 433–45, 2002.

SERHAN, C.N.. A search for endogenous mechanisms of antiinflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. *Histochem Cell Biol*. v. 122, p. 305-321, 2004.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J.. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. v. 6(12), p. 1191-7, 2005.

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

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology*. p.1–16, 2007.

SHANLEY, T. P.; WARNER, R. L.; WARD, P. A.. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol. Med. Today* v. 1, p. 40–45, 1995.

SIN, Y. M.; SEDGWICK, A. D.; CHEA, E.P.; WILLOUGHBY, D.A.. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: a six day air pouch model in the mouse. *Annals of the Rheumatic Diseases*. v. 45, p. 873-877, 1986.

SZOLCSÁNYI, J.; PINTÉR, E.; HELYES, Z.; OROSZI, G.; NÉMETH, J.. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol*. v. 4, p. 916-22, 1998.

TAYLOR, P.R.. A hierarchical role for classical-pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells *in vivo*. *J. Exp. Med*. v. **192**, p. 359–366, 2000.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

XIAO, Y.Q.; MALCOLM, K.; WORTHEN, G.S.. Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. v. 277, p.14884–14893, 2002.

WILLER, J.C.; BOUHASSIRA, D.; LE BARS, D.. Neurophysiological bases of the counterirritation phenomenon: diffuse control inhibitors induced by nociceptive stimulation. *Neurophysiol Clin*. v. 5, p. 379-400, 1999.