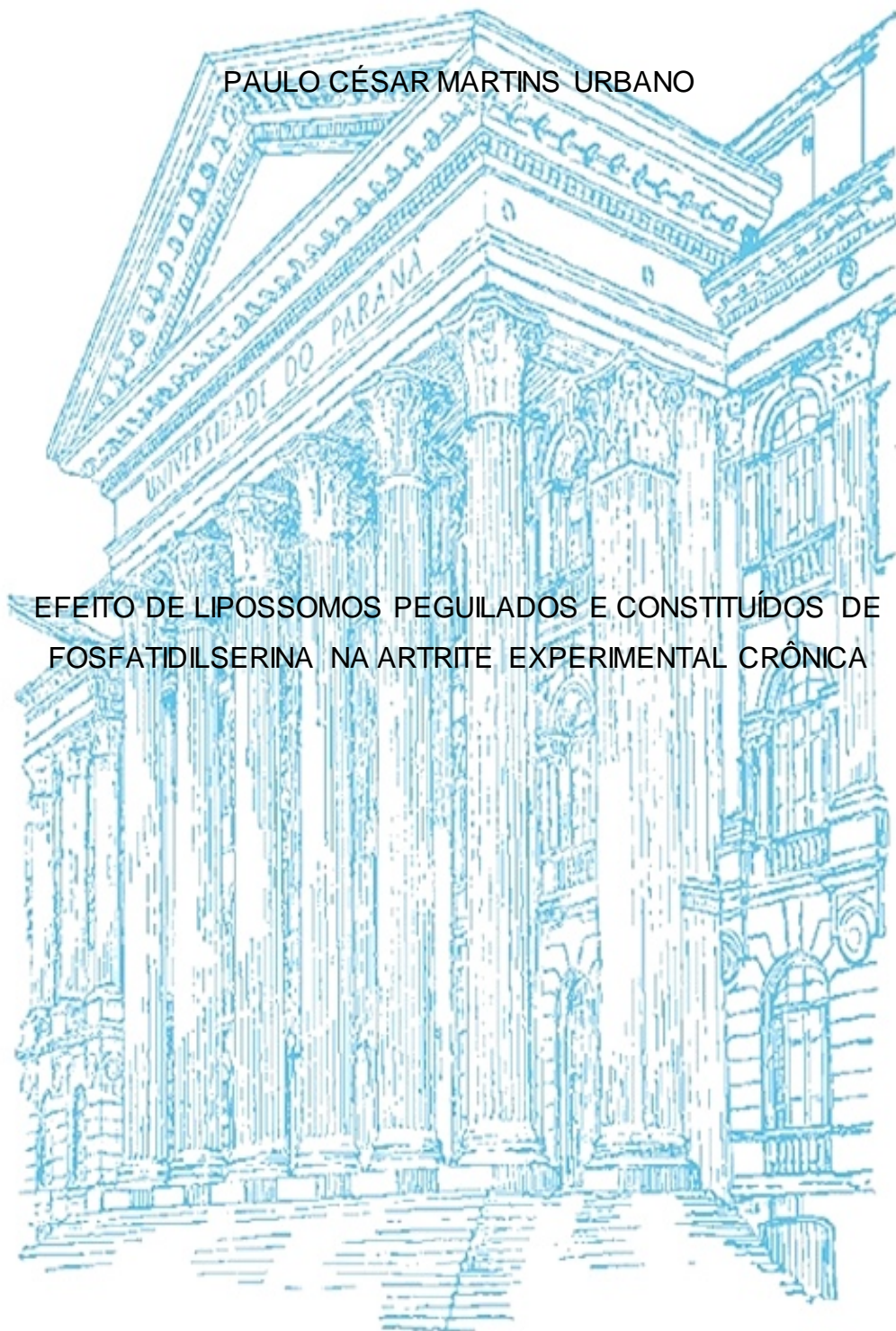


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO CÉSAR MARTINS URBANO

EFEITO DE LIPOSSOMOS PEGULADOS E CONSTITUÍDOS DE
FOSFATIDILSERINA NA ARTRITE EXPERIMENTAL CRÔNICA



CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO CÉSAR MARTINS URBANO

**EFEITO DE LIPOSSOMOS PEGULADOS E CONSTITUÍDOS DE
FOSFATIDILSERINA NA ARTRITE EXPERIMENTAL CRÔNICA**

CURITIBA

2013

PAULO CÉSAR MARTINS URBANO

EFEITO DE LIPOSSOMOS PEGULADOS E CONSTITUÍDOS DE
FOSFATIDILSERINA NA ARTRITE EXPERIMENTAL CRÔNICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª D.ra Vanete Thomaz Soccol
Co-orientador: Profº D.r Valderilio Feijó Azevedo

CURITIBA

2013

U72e

Urbano, Paulo César Martins

Efeito de lipossomos peguizados e constituídos de fosfatidilserina na artrite experimental crônica / Paulo César Martins Urbano. – Curitiba, 2013. 74f. : il. color. ; 30 cm.

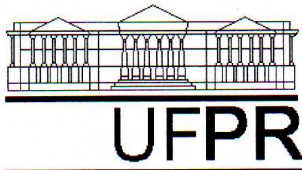
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2013.

Orientadora: Vanete Thomaz Soccol -- Co-orientador: Valderilio Feijó Azevedo.

Bibliografia: p. 63-73.

1. Fosfatidilserina. 2. Artrite reumatóide I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Vanete Thomaz. III. Azevedo, Valderilio Feijó. IV. Título.

CDD: 616.7227



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


Aos dezesseis dias do mês de agosto de 2013, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do Prédio da Administração, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Septuagésima Oitava Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Dr Ricardo Machado Xavier (UFRS), Drª Silvana Maria Alban (UFPR), Dr Valderílio Feijó Azevedo (UFPR), e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol (UFPR- orientadora da dissertação).

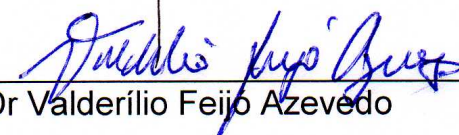
Às 8h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Paulo César Martins Urbano** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “**Efeito de Lipossomos Peguilados e Constituídos de Fosfatidilserina na Artrite Experimental Crônica**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Dr Ricardo Machado Xavier, Drª Silvana Maria Alban, Dr Valderílio Feijó Azevedo, e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol declarou o candidato APROVADO (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 16 de Agosto de 2013.




Dr Ricardo Machado Xavier



Dr Valderílio Feijó Azevedo



Drª Silvana Maria Alban



Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

Em meio a três rigorosos invernos em Curitiba/PR meu acalento noturno, força e, sobretudo incentivo, vieram da minha querida família, que ao contrário da minha pessoa, deslumbravam-se com o calor e aconchego de Natal/RN. Ao meu Pai, João Bosco Urbano, a minha Mãe, Maria das Graças Martins Urbano, as minhas irmãs, Patrícia Martins Urbano e Rhuama Martins Urbano, dedico este árduo e prazeroso trabalho, que de certa forma me definiu.

AGRADECIMENTOS

Ao Profº D.r Valderilio Feijó Azevedo e a EDUMED, pelo apoio financeiro, pelos diversos contatos e principalmente por disponibilizar autonomia e credibilidade as minhas ideias “malucas”.

À Profª D.ra Vanete Thomaz Soccol que se colocou à disposição ao se deparar com minhas ideias “revolucionarias” e muitas vezes utópicas (Nobel de 2020).

À Profª D.ra Luciana Porto de Souza Vandenberghe pelo empenho em acelerar os tramites burocráticos na concessão de diárias e reagentes, preciosos para a evolução do projeto.

Ao Profº D.r Ricardo Xavier Machado pela disponibilidade em ajudar e conceder-me o prazer de trabalhar no laboratório de experimentação animal no Hospital das Clínicas de Porto Alegre.

À equipe do laboratório de experimentação animal representada pela D.ra Patrícia Gnieslaw de Oliveira, D.ra Lidiane Isabel Filippin e M.^a e doutoranda Vivian Nunes Teixeira. Vocês foram incríveis. Agradeço pelo apoio, carinho e dedicação neste projeto. Muito obrigado.

À D.ra Carolina de Oliveira e ao graduando Gustavo Rossi do departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná pelo apoio incondicional nos experimentos *in vitro*.

Ao M.e Wagner Hugo Bonat Laboratório de Estatística e Geoinformação da UFPR, pelo apoio nas análises estatísticas.

À Profª D.ra Sayuri Miyamoto que me proporcionou um suporte sem igual na avaliação do processo de oxidação dos lipossomos.

À Profª D.ra. Iolanda M. Cuccovia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) pela pronta disponibilidade em conceder-me análises fisicoquímicas dos lipossomos.

À D.ra Zahra Mirafzali chefe executiva da Encapsula NanoSciences pelo suporte na produção dos lipossomos.

À M.^a e doutoranda Fernanda Corrêa da Silva Vasconcellos pelo indispensável suporte técnico e emocional nesta jornada de dois anos.

À M.^a e Doutoranda Ludmilla Della Coletta Troiano pelo suporte sem igual nas diversas etapas do projeto.

Ao M.e e Doutorando Ricardo Cancio Fendrich que me auxiliou e transferiu valiosos conhecimentos na Biotecnologia.

À D.ra e pós-doutoranda Silvana Alban por vezes ter me auxiliado no dia-a-dia da bancada.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular do Curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Ao órgão governamental Capes que disponibilizou auxílio financeiro durante o curso.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelo modo visionário que vem conduzindo os seus pesquisadores.

À minha família, que durante minha estadia em Curitiba tem me dado um apoio incondicional.

“The most exciting phrase to hear in Science, the one that heralds new discoveries, is not “eureka!” but “that’s funny...”

Issac Asimov (1920–1992)

RESUMO

A Artrite reumatoide (AR) é uma doença auto-imune inflamatória, que acomete as articulações, promovendo acúmulo de células na região sinovial, danos na cartilagem e formação de *pannus*. Nos últimos anos o emprego de lipossomos constituídos de fosfatidilserina (LFS), demonstrou reduzir a inflamação em modelos animais de artrite aguda, supostamente por mimetizar o processo da apoptose. Esta nova alternativa surge como possível terapia da AR.

Objetivo: A pesquisa teve por objetivo avaliar a eficácia de lipossomos peguilados e constituídos de FS (LPeg-FS) em modelo de artrite experimental crônica, utilizando camundongos com artrite induzida por colágeno bovino tipo II (CIA) e sua ação imunomoduladora em *in vitro*. **Método:** A artrite foi induzida nos camundongos (n=24) por CIA no dia zero. No 18º dia, após a imunização, os animais receberam o *booster*. O tratamento iniciou-se no mesmo dia do *booster*, com administrações subcutâneas (s.c.) diárias no período de 20 dias. Foram constituídos quatro grupos experimentais; grupo 1 sem tratamento – solução salina (n=6), grupo 2 tratado com LPeg-FS numa concentração de 5 mg/kg (n=6), grupo 3 tratado com 10 mg/kg (n=6) e grupo 4 tratado com 15 mg/kg (n=6). Análise da oxidação de LPeg-FS por CLAE, escore clínico de gravidade, incidência da doença, peso dos animais e dosagens de citocinas das articulações dos joelhos dos animais foram avaliadas. Para análise da imunomodulação de LPeg-FS, foi realizado um estudo *in vitro* com culturas de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS)/Acetato de miristato de forbol (PMA). Para esse experimento foram formados seis grupos; cultura sem tratamento (G1), PBS (G2), 100 µM de LPeg-FS (G3), LPS/PMA (G4), LPS/PMA e PBS (G5) e LPS/PMA e LPeg-FS (G6). **Resultados:** LPeg-Fs nas doses de 10 mg/kg e 15 mg/kg não foi eficiente em reduzir o escore da doença nos animais. No entanto, o grupo LPeg-FS 5 mg/kg não apresentou o estágio mais avançado da doença, em comparação ao controle. Nas amostras das articulações dos joelhos coletados após o tratamento, os grupos LPeg-FS 15 mg/kg e 10 mg/kg, reduziram significativamente IL-6, IL-2, IFN-γ e TNF-α, respectivamente, mesmo apresentando um elevado escore clínico. Os experimentos não apresentaram uma relação entre a diminuição dessas citocinas com TGF-β1 no estudo *in vivo*. A incidência da doença e peso dos animais não foram afetadas pelo tratamento. Na concentração 100 µM de LPeg-FS não se verificou a redução da inflamação instaurada por LPS/PMA no estudo *in vitro*. A presença de produtos oxidados na solução de LPeg-FS foi observada. **Conclusão:** A resolução da doença *in vivo* e do processo inflamatório *in vitro* não foi observada. No entanto, LPeg-FS demonstrou regular a produção de TNF-α (LPeg-FS 10 mg/mL) e IL-6, IL-2, IFN-γ (LPeg-FS 15 mg/kg) nas articulações dos joelhos dos animais acometidos pela doença, por uma via de ação ainda desconhecida, aparentemente não relacionada com TGF-β1 e IL-10. Porém, tal efeito não repercutiu na melhora clínica dos animais. Novos estudos empregando novas dosagens e vias de administração alternativas, precisam ser realizados para avaliar a intervenção terapêutica de LPeg-FS em modelo experimental CIA.

Palavras-chave: Fosfatidilserina. Artrite reumatoide. CIA. Mimetização Apoptótica. Lipossomos.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease that affects the joints, promoting accumulation of synovial cells, cartilage damage and *pannus* formation. In recent years the use of phosphatidylserine-containing liposomes (PSL), showed reduced inflammation in animal model with acute inflammatory arthritis, presumably by apoptosis mimicry. This new alternative arises as a possible therapy against RA. **Objective:** The study aims to evaluate the effect of phosphatidylserine-containing pegylated liposomes (PS-PEGL) in mice with collagen-induced arthritis bovine type II (CIA) and its immunomodulating effects *in vitro*. **Methods:** Arthritis was induced in mice (n= 24) with bovine type II collagen (CII) on day zero. On the 18th day after immunization, the animals received *booster*. Treatment was initiated on the same day of the *booster*, with subcutaneous administration (s.c.) daily for 20 days. Four experimental groups were employed; untreated group - saline (n= 6) Group treated with PS-PEGL 5 mg/kg (n= 6), group treated with 10 mg/kg (n= 6) and treated group with 15 mg/kg (n= 6). PS-PEGL oxidation analysis by HPLC, clinical score, disease incidence, animal weight and cytokines of the knee joints of animals (IL- β 1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-10, TGF- β 1) *in vivo* and *in vitro* were employed. For analysis of immunomodulation of liposomes, a study was conducted *in vitro* with macrophages stimulated with LPS/PMA. Six experimental groups were formed, culture without treatment (G1), PBS (G2), PS-PEGL 100 μ M (G3), LPS/PMA (G4), LPS/PMA and PBS (G5) and LPS/PMA and PS-PEGL 100 μ M (G6). **Results:** PS-PEGL 10 mg/kg and 15 mg/kg was not effective in reducing the score of the disease in animals. However PS-PEGL 5 mg/kg was significant to prevent the animals did not show the advanced stage of the disease compared to the control. Samples collected from the knee joints after treatment, the groups PS-PEGL 15 mg/kg and 10 mg/kg, significantly reduced IL-6, IL-2, IFN- γ and TNF- α , respectively, even with a high clinical score. The experiments did not show a relationship between the decrease these cytokines and TGF- β 1. Incidence and weight of the animals were not affected by treatment. *In vitro*, PS-PEGL 100 μ M not verified the reduction of inflammation stimulated by LPS/PMA. Oxidized products in solution PS-PEGL was observed. **Conclusion:** *In vivo* and *in vitro* inflammation resolution through PS-PEGL was not observed, however PS-PEGL showed regulate at late stage of the disease TNF- α (PS-PEGL 10 mg/kg) and IL-6, IL-2 and IFN- γ (PS-PEGL 15 mg/kg) production in the knee joints of mice, through a yet unknown mechanism of action apparently not related to TGF- β 1 and IL-10. Further studies with new concentrations of PS-PEGL and alternative routes of liposomes administration need to be performed to evaluate the PS-PEGL therapeutic intervention in RA.

Key-Words: Phosphatidylserine. Rheumatoid Arthritis. CIA. Apoptosis Mimicry. Liposomes.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PERFIL DOS ESTUDOS COM LFS NOS ÚLTIMOS ANOS	38
TABELA 2 - ESCORE PARA AVALIAÇÃO SUBJETIVA DA ARTRITE NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
TABELA 3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ESTUDO <i>IN VITRO</i>	44
TABELA 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ESCORE CLÍNICO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	50
TABELA 5 - EFEITO DE LPEG-FS NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NAS ARTICULAÇÕES DOS JOELHOS DOS CAMUNDONGOS COM ARTRITE INDUZIDA POR CII.....	53
TABELA 6 - EFEITO DE LPEG-FS NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM CULTURA DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS/PMA.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T NA AR DESENCADEIA O PROCESSO INFLAMATÓRIO SINOVIAL.....	22
FIGURA 2 - CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE DE PACIENTES PARA DIAGNOSTICAR A AR.	24
FIGURA 3 - MECANISMO DE AÇÃO DA CIA	28
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FOSFOLIPÍDIO FS.	30
FIGURA 5 - INTERAÇÃO DE FS NAS IMUNOGLOBULINAS TIM-1 E TIM-4 EM CAMUNDONGOS.	31
FIGURA 6 - RECEPTORES DE CÉLULAS FAGOCITÁRIAS E PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM FS, CARACTERIZANDO O EVENTO DA APOPTOSE.	32
FIGURA 7 - ESTRUTURA LIPOSSOMAL CONVENCIONAL.....	33
FIGURA 8 - ANÁLISE DE PRODUTOS OXIDADOS POR CLAE.	47
FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DO ESCORE POR MODELO ESTATÍSTICO NÃO LINEAR.	49
FIGURA 10 - INCIDÊNCIA DA DOENÇA NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.	51
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DE GANHO OU PERDA DE PESO DOS ANIMAIS NO PERÍODO DE TRATAMENTO.	51
FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α , IL-6, IL-2 E IFN- γ DOS JOELHOS DOS CAMUNDONGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.	52
FIGURA 13 - QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α , IL-6 E TGF- β 1 EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS/PMA POR CITOMETRIA DE FLUXO.	55

LISTA DE SIGLAS

AA	–	Artrite induzida por adjuvante
A _c M	–	Anticorpos monoclonais
AIA	–	Artrite Induzida por antígeno específico
AINES	–	Anti-inflamatórios não esteroides
AINH	–	Anti-inflamatórios não hormonais
Anti-CCP	–	Anti-proteínas citrulinadas
AP	–	Artrite psoriásica
AR	–	Artrite reumatoide
CDR	–	Região determinante de complementaridade
CFA	–	Adjuvante completo de Freund's
CIA	–	Artrite Induzida por colágeno
CII	–	Colágeno bovino tipo II
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPA	–	Célula apresentadora de antígeno
DAS28	–	Escore da atividade da doença nas 28 articulações
DMCD	–	Drogas modificadoras do curso da doença
DSPE-Peg2000	–	1,2-diesterol-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-(polietilenoglicol)-2000
EM	–	Espectrometria de massa
EPR	–	Efeito de retenção e permeabilidade
FC	–	Fosfatidilcolina

FS	–	Fosfatidilserina
GM-CSF	–	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
i.d.	–	Intradérmica
IFN- γ	–	Interferon gama
Ig	–	Imunoglobulina
IgG	–	Imunoglobulina G
IL	–	Interleucina
LPEG-FS	–	Lipossomo peguilados constituídos de fosfatidilserina
LPS	–	Lipopolissacarídeos
MHC	–	Complexo principal de histocompatibilidade
MILIBS	–	Sítio de ligação íon metálico dependente
OVA	–	Atrite induzida por ovalbumina
PCR	–	Proteína C-reativa
PEG	–	Polietileno glicol
PGE2	–	Prostaglandina E2
PMA	–	Acetato de miristato de forbol
RANKL	–	Receptor ativador de fator nuclear kappa-B
rFS	–	Receptor de fosfatidilserina
rTNF- α	–	Receptor do fator de necrose tumoral alfa
s.c.	–	Subcutânea
SER	–	Sistema reticuloendotelial
SFB	–	Soro fetal bovino

TGF- β	–	Fator de crescimento e transformação Beta
TIM	–	Imunoglobulina mucina de célula T
TNF- α	–	Fator de necrose tumoral
VSG	–	Velocidade da sedimentação globular
μM	–	Micromolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVO	20
2.1.	OBJETIVO GERAL	20
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1.	ARTRITE REUMATOIDE	21
3.1.1.	EPIDEMIOLOGIA, GENÉTICA E ETIOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE	21
3.1.2.	PATOGENIA DA ARTRITE REUMATOIDE: ROTAS IMUNOLÓGICA.	22
3.1.3.	DIAGNÓSTICO	23
3.1.4.	TRATAMENTO	25
3.1.5.	MODELO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR COLÁGENO BOVINO TIPO II (CIA)	26
3.2.	FOSFATIDILSERINA: MECANISMO DE AÇÃO	29
3.3.	LIPOSSOMOS: CONCEITO E PROCESSO DE PRODUÇÃO	33
3.4.	LIPOSSOMOS FS: APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.	ÉTICA EXPERIMENTAL	40
4.2.	LIPOSSOMOS	40
4.3.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS	41
4.4.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	41
4.5.	PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS COM COLÁGENO BOVINO TIPO II (MODELO DE POLIARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO)	42
4.6.	ESCORE CLÍNICO, INCIDÊNCIA E PESO DOS ANIMAIS	43
4.7.	AÇÃO IMUNOMODULADORA <i>IN VITRO</i> DE LPEG-FS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS/PMA	44
4.8.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1 β E TGF- β 1 POR REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA (ELISA)	45

4.9.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A E IL-10 POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
4.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5.	RESULTADOS	47
5.1.	A SOLUÇÃO DE LPEG-FS APRESENTOU PRODUTOS OXIDADOS DE FOSFOLIPÍDIOS.....	47
5.2.	ANIMAIS TRATADOS COM LPEG-FS 5 mg/kg NÃO APRESENTARAM O ESTÁGIO AVANÇADO DA DOENÇA	48
5.3.	NÍVEIS DE TNF- α , IL-6, IL-2 E IFN- γ NAS ARTICULAÇÕES DOS JOELHOS DOS ANIMAIS FORAM REDUZIDOS NOS GRUPOS TRATADOS COM 15 E 10 mg/kg SEM APARENTE RELAÇÃO COM TGF- β 1.....	52
5.4.	AVALIAÇÃO DE TNF- α E IL-6 EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS/PMA	53
6.	DISCUSSÃO	56
7.	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO I	74

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica inflamatória das articulações que afeta em torno de 1% da população mundial. A doença acomete duas vezes mais as mulheres do que os homens (SENNA *et al.*, 2004). Sua incidência aumenta com a idade e o pico ocorre entre os 30 e 70 anos (KLIPPEL, 2001). É uma enfermidade reumática de alta prevalência e morbidade, justificando os esforços na elucidação de sua patogênese, diagnóstico e tratamento (HARRIS, 1990).

A patologia da sinovite reumatoide caracteriza-se fundamentalmente por proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral (RINDFLEISCH; MULLER, 2005). Embora se desconheça o evento desencadeador, parece envolver alguma estimulação antigênica específica de linfócitos T suscetíveis que expressam as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) apropriadas. Isto resulta em proliferação das células T e B, estimulação da proliferação de vasos sanguíneos na membrana sinovial, acúmulo de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento de um *pannus* invasivo de rápido crescimento. Este último invade a cartilagem, ativando os condrócitos, liberando enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, resultando por fim em erosões e destruição articular (BERGLIN *et al.*, 2004; AUGER *et al.*, 2005).

Esta patologia apresenta complicações importantes que podem levar ao comprometimento da capacidade funcional, do trabalho e da qualidade de vida dos pacientes (TUGWELL *et al.*, 2004). O curso da doença é variado e protocolos de tratamento mais recentes indicam que uma terapia agressiva nos primeiros eventos da doença, como a utilização de drogas biológicas (anticorpos monoclonais e proteínas de fusão) em monoterapia ou em combinações com outras medicações, podem desacelerar a evolução da doença (TUGWELL *et al.*, 2004). No entanto, mesmo com o avanço nas terapias biológicas, alguns pacientes tornam-se não-responsivos ao longo do tratamento devido a imunogenicidade das moléculas. Assim, são necessárias

alternativas terapêuticas que apresentem baixa imunogenicidade para estes pacientes e eficácia similar e/ou superior.

A fosfatidilserina (FS) pode tornar-se uma destas novas moléculas terapêuticas promissoras para o tratamento da AR.

FS é um fosfolipídio que está presente no lado interno da membrana plasmática de células mamíferas, sendo externalizada na apoptose celular (FADOK *et al.*, 1992). Esta exposição sinaliza o evento da apoptose aos macrófagos, que por sua vez possuem receptores que identificam FS (SANTIAGO *et al.*, 2007), resultando no engolfamento dos corpos apoptóticos e promoção de uma ação anti-inflamatória, principalmente pela secreção de TGF- β 1 (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002). Na AR, os níveis de apoptose celular nas regiões inflamadas são extremamente baixas, resultando na aglomeração celular e cronicidade da doença (LIU; POPE, 2003).

Recentes pesquisas têm empregado lipossomos (vesículas constituídas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas) expondo FS com o intuito de mimetizar o processo apoptótico. Os resultados demonstraram a redução do processo inflamatório em modelo experimental de artrite aguda induzida por carragenina e adjuvante completo de Freud (CFA) (RAMOS *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2010; MA; WU; NAKANISHI, 2011).

Quando se emprega lipossomos, o objetivo principal é disponibilizar fármacos encapsulados no interior da vesícula lipossomal. No contexto de lipossomos constituídos de FS (LFS), o próprio fosfolipídio tornar-se-á um terapêutico com diversas aplicações.

Alternativas terapêuticas são necessárias para pacientes portadores de artropatias inflamatórias crônicas que eventualmente cursam com falha no tratamento.

Diante da necessidade de prospectar novos terapêuticos, o efeito de LFS através da mimetização apoptótica, poder ser uma nova alternativa no tratamento da AR. Assim, avaliar o efeito de LFS em modelo de artrite experimental crônica é fundamental para delinear o impacto exercido no processo inflamatório e analisar o potencial de LFS na terapia antirreumática.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de lipossomos peguilados e constituídos de fosfatidilserina (LPeg-FS), no modelo de artrite experimental crônico, induzida por colágeno bovino tipo II e o efeito imunomodulador *in vitro* em linhagem de macrófagos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar o processo de oxidação fosfolipídica;
- b) Mensurar o escore clínico e incidência da doença nos diferentes grupos experimentais;
- c) Avaliar perda e ganho de peso dos animais no decorrer do experimento;
- d) Mensurar a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias dos tecidos periarticulares (*in vivo*) e do sobrenadante dos macrófagos (*in vitro*) por citometria de fluxo (CBA) e por ensaio imunoenzimático (ELISA).
- e) Mensurar o impacto do tratamento pela análise histológica das patas dos animais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ARTRITE REUMATOIDE

3.1.1. EPIDEMIOLOGIA, GENÉTICA E ETIOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

A AR tem uma prevalência de cerca de três vezes mais em mulheres em comparação aos homens. A incidência de AR é seis vezes maior em mulheres entre 60 e 64 anos de idade, comparado a mulheres entre 18 e 29 anos de idade (RINDFLEISCH; MULLER, 2005).

Em relação aos indivíduos saudáveis, os pacientes com AR têm três vezes mais custos em saúde e também são duas vezes mais propensos a necessitar de hospitalização (BIRNBAUM *et al.*, 2000).

No Brasil, o estudo de Senna *et al.* (2004), mostrou prevalência de 0,46% na população brasileira. Porém, há dificuldade de se estudar as fases iniciais da doença devido o diagnóstico ocorrer em fases mais tardias e crônicas da doença.

O maior risco para a concordância de AR é observado em gêmeos que possuem dois alelos HLA-DRB1, gene associado com a doença. A classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) do alelo HLA-DR4 (DR β 1*0401) e alelos relacionados, são conhecidos por serem fatores de risco genéticos para a doença. Estudos anteriores mostraram que enquanto 70% dos pacientes com AR expressam HLA-DR4, os indivíduos do grupo controle apresentaram apenas 28% (BERGLIN *et al.*, 2004; AUGER *et al.*, 2005). Indivíduos portadores da AR têm risco significativamente aumentado de morte em comparação a indivíduos não portadoras. Os determinantes desse excesso de mortalidade ainda não estão claros, no entanto, pesquisas sugerem um aumento do risco de doenças gastrointestinais, respiratórias, cardiovasculares, infecciosas e hematológicas em pacientes com AR em comparação com os controles

(BOJINCA; JANTA, 2012; GABRIEL; CROWSON, 2012; HAMBLIN; HORTON, 2011).

Apesar da extensa investigação epidemiológica, a etiologia da AR é desconhecida. Vários fatores de risco foram sugeridos como importante para o desenvolvimento da doença. Estes incluem genética, agentes infecciosos, contraceptivos orais e tabagismo (KLARESKOG, 2006).

3.1.2. PATOGENIA DA ARTRITE REUMATOIDE: ROTAS IMUNOLÓGICAS

O processo molecular que desencadeia a AR ainda é desconhecido. No entanto, os agentes que promovem o processo inflamatório já estão bem descritos pela literatura (MCINNES; SCHETT, 2007).

Um dos principais eventos da doença é a ativação de células T (Figura 1) na região sinovial. Esse processo desencadeia uma série de

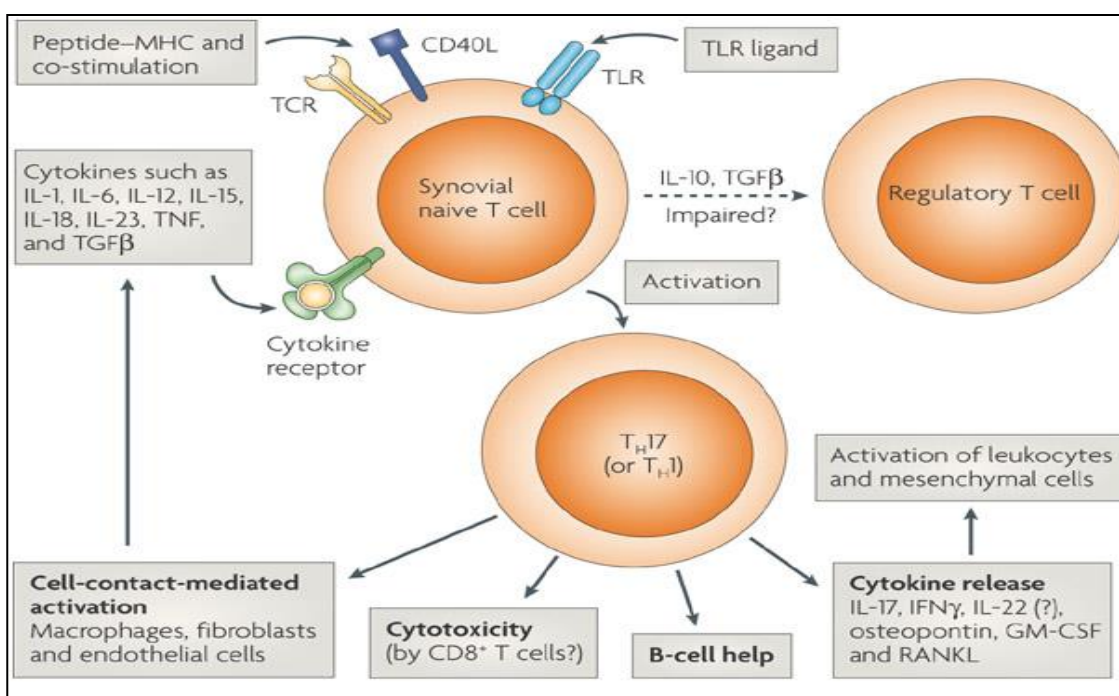


Figura 1 - Ativação de células T na AR desencadeia o processo inflamatório sinovial. As células T sinoviais são ativadas por receptores de células T (TCR), receptores Toll-Like (TLR), por peptídeos do MHC II e co-estimuladores, resultando na ativação de células Th17, que por sua vez, promoverá a ativação e células B help, leucócitos, células mesenquimais, possivelmente de células T CD8, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais que irão produzir citocinas que estimularão o processo inflamatório crônico. As células T regulatórias não apresentam atividade regulatória ideal na AR, sendo fonte de diversas pesquisas. Fonte: MCINNES e SCHETT (2007).

ações que resultarão na deflagração da inflamação crônica, ativando diversos tipos celulares como linfócitos CD4, Th17, CD8+, células B help, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e osteoclastos.

Macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos T após estímulo, produzem de forma exacerbada, mediadores inflamatórios (secretados por diferentes tipos celular) como interleucina 17 (IL-17), interferon gama (IFN- γ), IL-1 β , IL-6, IL-12, fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), receptor ativador de fator nuclear kappa-B (RANKL) e principalmente o fator de necrose tumoral (TNF- α), uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias na AR e demais doenças auto-imunes (MCINNES; SCHETT, 2007). Por fim, ocorre a promoção da angiogênese, degradação da cartilagem por colagenases, formação do *pannus*, tecido vascularizado composto de células de proliferação sinovial de vasos sanguíneos, e reabsorção óssea pelos osteoclastos que resultará na erosão óssea que causará as peculiares deformidades da AR, comprometendo a motricidade das articulações (MCINNES; SCHETT, 2007).

3.1.3. DIAGNÓSTICO

Atualmente a AR não possui um teste de diagnóstico com elevada precisão no início da doença (RINDFLEISCH; MULLER, 2005). A necessidade de pesquisar e avaliar novos marcadores moleculares que possibilitem o diagnóstico precoce, é fundamental.

A avaliação subjetiva comumente empregada para o diagnóstico da AR, depende da associação de uma série de sintomas e sinais característicos, dados laboratoriais e achados radiológicos (LIPSKI PE., 2008).

A Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) (Figura 2) apresentou critérios subjetivos contudentes para o diagnóstico da AR (ALETAHA *et al.*, 2010).

Os dois principais testes laboratoriais comumente empregados no diagnóstico da AR é o teste de fator Reumatoide e o teste de anticorpos

anti-proteínas citrulinadas (Anti-CCP). Outros testes que podem ser realizados incluem: velocidade da sedimentação globular (VSG), Hemograma completo, proteína C-reativa (PCR), ultra-som ou ressonância magnética conjuntas, raios-x e análise do líquido sinovial. Questionários subjetivos também são empregados como o escore da atividade da doenças nas 28 articulações (DAS28) (RINDFLEISCH; MULLER, 2005).

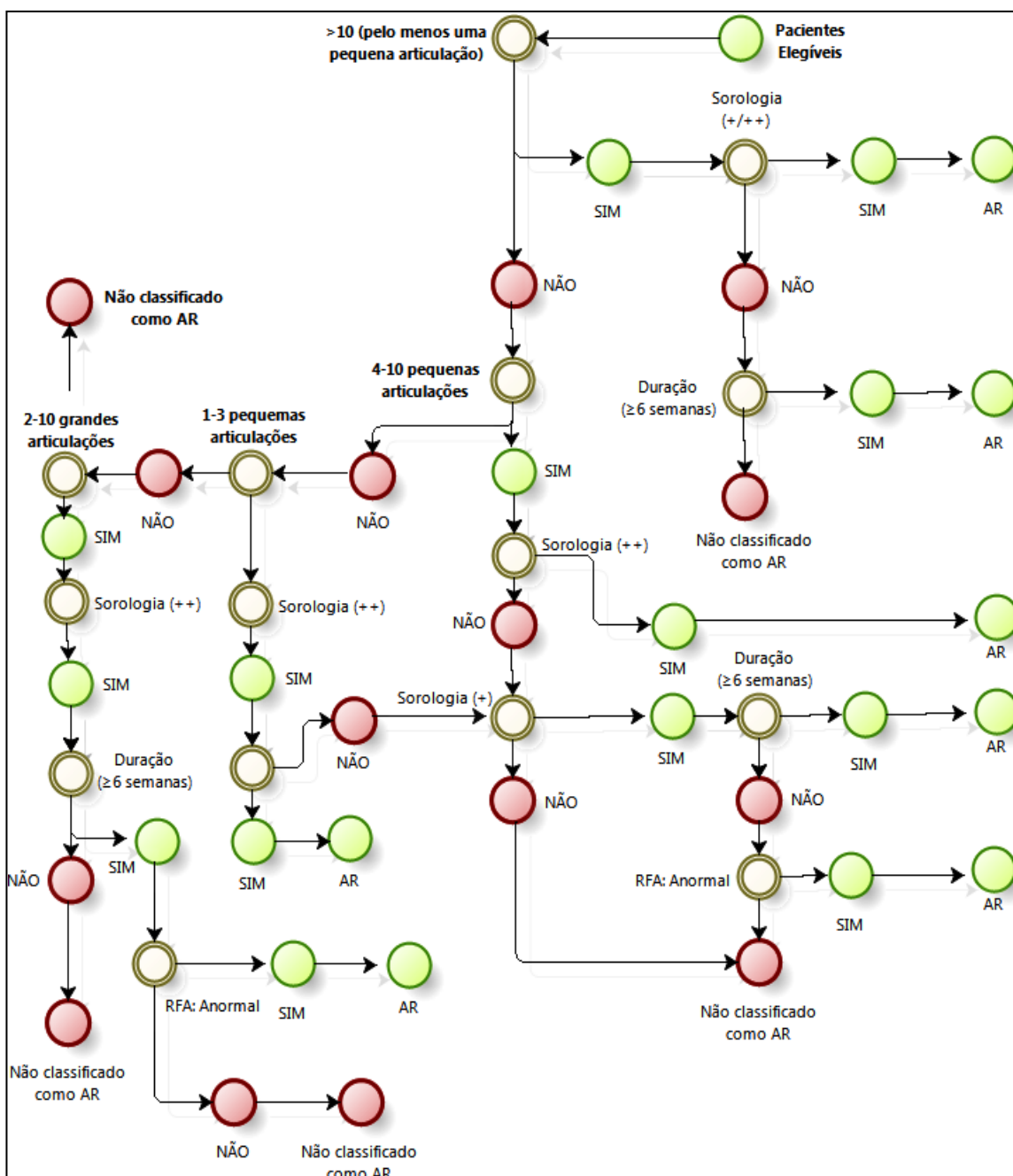


Figura 2 – Critérios de elegibilidade de pacientes para diagnosticar a AR. RFA; resposta de fase aguda. Adaptado e traduzido pelo auto. Fonte: ALETAHA *et al.*, (2010).

3.1.4. TRATAMENTO

O tratamento da AR envolve o uso de medicamentos, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas. As terapias medicamentosas empregam anti-inflamatórios não hormonais (AINH), anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), corticoides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas e biológicas, além de drogas imunossupressoras (MOTA *et al.*, 2012).

Na falha de medicamentos químicos, são empregados os medicamentos denominados biológicos, responsáveis por uma revolução no tratamento da AR na última década (CHANG; GIRGIS, 2007). Atualmente são comercializados oito medicamentos biológicos no combate a AR no Brasil.

Os denominados anti-TNF- α Etanercepte (Enbrel[®] – proteína de fusão), Infliximabe (Remicade[®] – anticorpo monoclonal quimérico), Adalimumabe (Humira[®] – anticorpo monoclonal humanizado), Certolizumabe pegol (Cimzia[®] – fragmento Fab' peguilado) e o Golimumabe (Simponi[®] – anticorpo monoclonal humano), bloqueiam especificamente o TNF- α (principal molécula na progressão inflamatória da AR), reduzindo o processo inflamatório (RENDAS-BAUM *et al.*, 2011).

O Abatacepte (Orencia[®]) é uma proteína de fusão que bloqueia especificamente receptores CD28 em células citotóxicas T (CTLA-4), responsáveis na imunomodulação da AR (VITAL; EMERY, 2006).

O Tocilizumabe (Actemra[®]), anticorpo monoclonal humanizado, bloqueia os receptores de IL-6 (rIL-6) que se ligam a IL-6 solúvel (sIL-6), sendo esta uma molécula envolvida no processo pró-inflamatório (RENDAS-BAUM *et al.*, 2011).

As células B também são alvos fundamentais para a depleção da AR. Para esse alvo emprega-se o Rituximabe (Mabthera[®]), anticorpo monoclonal contra os receptores CD20. Este anticorpo promove a destruição dos linfócitos B ao se ligar aos marcadores CD20 na superfície dessas células (RENDAS-BAUM *et al.*, 2011).

Mesmo com os visíveis benefícios aos portadores de AR e outras artropatias, a problemática na utilização de biológicos é a imunogenicidade que estas moléculas apresentam ao decorrer do tratamento (CHANG; GIRGIS, 2007). Mesmo anticorpos totalmente humanizados tendem a perder sua eficiência, após a produção de auto-anticorpos contra sua estrutura ao decorrer de longos períodos de tratamento (BARTELD'S *et al.*, 2011). Assim, alguns pacientes tendem a descontinuar o medicamento, empregando outro biológico (RENDAS-BAUM *et al.*, 2011).

Além de complicações relacionadas à imunogenicidade dos biológicos, há também a possibilidade da reincidência de doenças como tuberculose, e hepatites, pois a ação imunossupressora desses medicamentos tendem a promover uma maior susceptibilidade a enfermidades persistentes (MILLER; ERNST, 2009; VIGANÒ *et al.*, 2012). A necessidade de testes para avaliar possíveis enfermidades latentes como tuberculose, hepatites dentre outras é crucial para o início do tratamento (RENDAS-BAUM *et al.*, 2011).

3.1.5. MODELO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR COLÁGENO BOVINO TIPO II (CIA)

Existem diversos modelos animais que mimetizam parcialmente a AR. A artrite pode ser induzida por meio de pristina (PIA), adjuvante (AA), antígeno específico (AIA), ovalbumina (OIA), colágeno bovino tipo II (CIA), animais transgênicos, dentre outras intervenções (PANDEY, 2010).

A AR ainda é uma doença exclusivamente humana. As diferentes técnicas de indução da artrite, mesmo com similaridades, não possuem o mecanismo inflamatório plenamente idêntico a doença que acomete o ser humano. Além disso, os modelos animais possuem limitações, por serem populações homogêneas e apresentarem componentes do sistema imune distintos do humano (FIRESTEIN, 2009).

Medicamentos biológicos como os anticorpos monoclonais anti-CD20, por exemplo, funcionam na CIA apenas se administrados no início da doença, mas não na doença já estabelecida, pois as células B participam

apenas do estágio inicial da CIA, e este medicamento afeta apenas este tipo celular, na qual apresenta os receptores CD20 (FIRESTEIN, 2009). O Metotrexate também possui efeitos modestos na CIA (LANGE *et al.*, 2005). No entanto, existem os dados positivos como por exemplo, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que são notavelmente eficazes em artrite induzida por adjuvante em ratos, mas fornecem em humanos um moderado alívio na AR (FIRESTEIN, 2009). Porém o Etanercept, proteína de fusão anti-TNF α , eficaz em pacientes, também reduz a artrite em CIA (WANG *et al.*, 2013).

Mesmo com questionamentos a cerca desses modelos, estes ainda são indispensáveis para a triagem de novos tratamentos na AR. O que se deve levar em consideração é o mecanismo indutor da artrite nesses modelos, assim a avaliação da eficácia da droga será de acordo com um determinado componente imunológico. A CIA, por exemplo, modelo crônico, depende da imunidade adaptativa e humoral (células T e B) e do sistema complemento para a indução da doença (SVENSSON *et al.*, 1998; BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007). Enquanto que o modelo AA com ação antigênica específica, dependente exclusivamente de células T (BRACKERTZ; MITCHELL; MACKAY, 1977; VAN DEN BERG; JOOSTEN; VAN LENT, 2007; TEIGE *et al.*, 2010). Assim, drogas que exerçam ação sobre esses componentes irão apresentar uma resposta contra a doença.

Atualmente existe uma mobilização científica para a criação de animais com o sistema imune humanizado. Tal feito revolucionará os ensaios pré-clínicos de medicamentos biológicos e químicos na AR e diversas doenças (HEGEN *et al.*, 2008).

A CIA é o modelo mais utilizado (Figura 3) para o teste de novos terapêuticos (PANDEY, 2010). Os animais utilizados neste modelo são os camundongos DBA/1. A susceptibilidade desses animais a CIA, está ligada MHC II. Estudos demonstraram que camundongos com haplótipo H-2q (DBA/1) possuem maior susceptibilidade à doença (CAMPBELL; HAMILTON; WICKS, 2000; INGLIS *et al.*, 2008). As lesões estruturais na CIA são mais análogas à AR humano, sendo uma ótima opção para estudos pré-clínicos de drogas (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977).

É empregado neste modelo o colágeno tipo II (CII) principalmente de frango e boi, por terem uma similaridade com o colágeno murino (PANDEY, 2010). O processo de imunização tem por objetivo quebrar a tolerância do

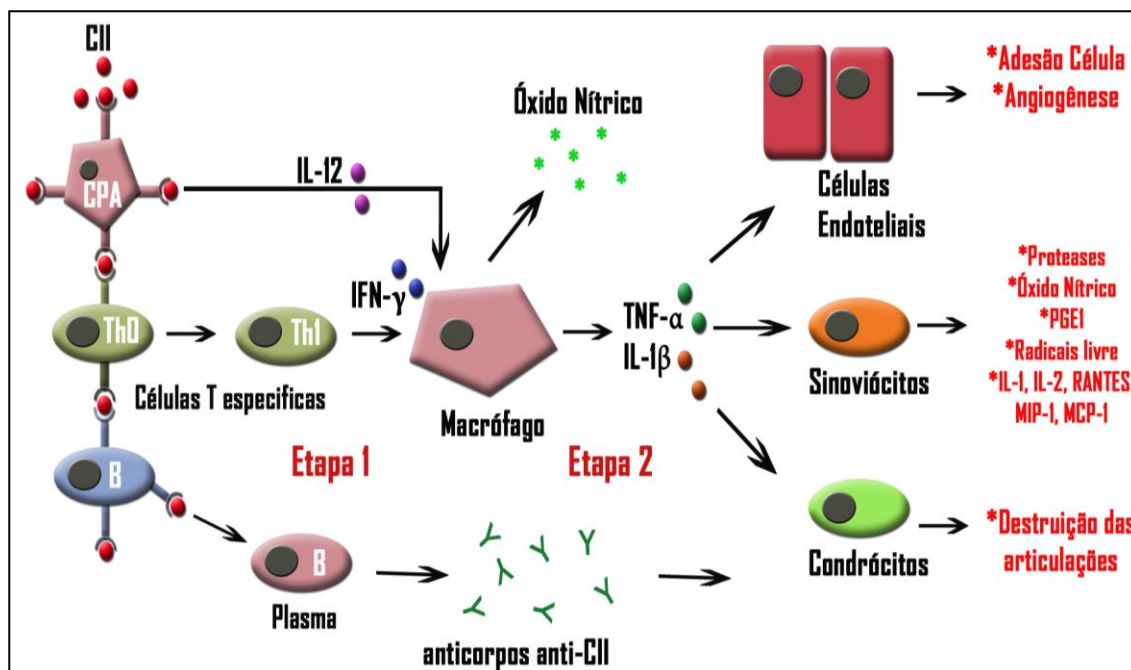


Figura 3 - Mecanismo de ação da CIA. CPA, Célula apresentadora de antígeno; B, Célula B; PGE1; Prostaglandina 1; IL, Interleucina; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ , Interferon Gama; RANTES, Regulação na ativação de células T normais na expressão e secreção. Adaptado e traduzido pelo autor. Fonte: PANDEY (2010).

sistema imune, resultando na patologia auto-imune crônica. As células da classe Haplótipos MHC II apresentam as células T, os antígenos do colágeno bovino. Para maior resposta inflamatória e incidência da doença, também é empregado em conjunto o adjuvante completo de Freud (CFA) (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

As células Th0 apresentam os antígenos às células B, que produzirão os anticorpos contra o colágeno bovino (exclusivo desse modelo). Ao mesmo tempo as células Th0 ativam as células Th1 que produzirão Interferon-gama (IFN- γ), ativando os macrófagos. Os macrófagos produzirão citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 dentre outras), promovendo a adesão celular, ativação de condrócitos e sinoviócitos, ocasionando o processo crônico da doença pela destruição progressiva das articulações.

As células T desempenham papel na fase de indução da doença, no apoio à ativação de células B e macrófagos, mas tem uma menor ação na fase crônica (PANDEY, 2010).

3.2. FOSFATIDILSERINA: MECANISMO DE AÇÃO

A apoptose é o fenômeno da morte celular programada. Sua deflagração é dada por sinais externos ou internos, resultando na formação de vesículas, encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e fragmentação do DNA cromossômico (TAIT; GREEN, 2010). A apoptose é um dos mais importantes eventos homeostáticos do organismo, promovendo o equilíbrio populacional das células, do crescimento celular diferenciado (tumores), das células infectadas por patógenos, além de ser uma morte “limpa” sem a necessidade de deflagrar resposta imune, ao contrário da necrose que expõe produtos intracelulares tóxicos as células vizinhas, resultando em um processo inflamatório (WYLLIE, 1987).

O processo evolutivo da apoptose ocorreu a cerca de 60 milhões de anos e tem como etapa fundamental a exposição do fosfolipídio fosfatidilserina (FS). Nesse período o organismo aprimorou-se para se adaptar e se beneficiar deste mecanismo (SCHLEGEL; WILLIAMSON, 2001).

Nos últimos anos estudos sobre a FS tem despertado o interesse dos pesquisadores por sua característica anti-inflamatória exercida no evento da apoptose celular (SAVILL; GREGORY, 2007).

FS é um fosfolipídio que corresponde a cerca de 10% de todos os fosfolipídios presentes na membrana plasmática das células (WEISMANN; BINDER, 2012). É eventualmente encontrado no folheto interno da membrana plasmática de células viáveis. Estruturalmente, FS é constituída por três grupos ionizáveis (Figura 4), a molécula de fosfato, o grupo funcional amina (porção hidrofílica) e o grupo funcional carboxílico (calda de ácidos graxos saturados e insaturados – porção hidrofóbica) (HANAHAN, 1997).

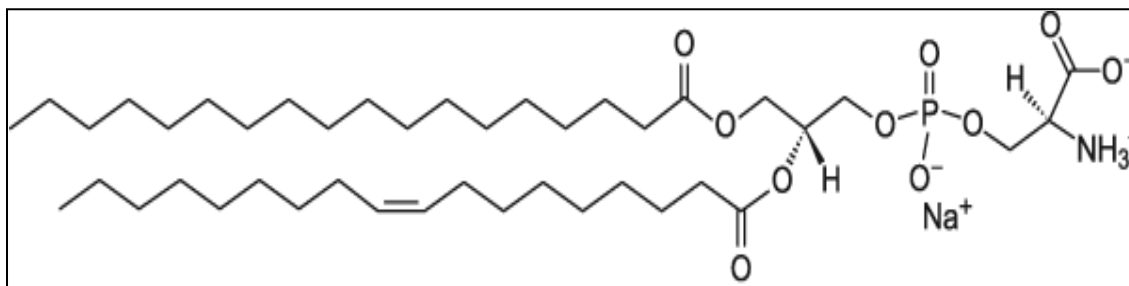


Figura 4 – Estrutura química do fosfolípido FS. Fonte: <http://www.avantilipids.com>

A externalização de FS é reconhecido por macrófagos que engolfam os corpos apoptóticos, impedindo a deriva de compostos intracelulares no líquido extracelular, que venham acarretar efeitos tóxicos as células vizinhas (SCHLEGEL *et al.*, 1996; SAVILL, 1997; FADOK *et al.*, 2000, 2001; WU; TIBREWAL; BIRGE, 2006; SAVILL; GREGORY, 2007; PAIDASSI *et al.*, 2009; FADEEL; XUE; KAGAN, 2010).

A função de tal fosfolípido não se restringe apenas ao reconhecimento ou sinalização de células em apoptose. Após sua interação com macrófagos, ocorre inibição da resposta inflamatória (CARR; GUARCELLO; BLALOCK, 1992).

Estudos relacionados com a funcionalidade de FS embasam ainda mais sua indispensável importância na captação de células em apoptose e inibição de resposta imune (FADOK *et al.*, 2001).

Segundo os estudos de Caselli *et al.* (1992), FS foi identificada como o único fosfolípido carregado negativamente, capaz de inibir a atividade de linfócitos, ao contrário de outros fosfolípidos tais como ácido fosfatídico e fosfatidilglicerol.

Hanayama *et al.* (2004) descreveram FS como indispensável na ligação entre a célula em processo de apoptose e o fagócito, e ainda revelaram que a proteína MFG-E8 é um fator crucial nessa ligação.

Asano *et al.* (2004) demonstraram que após o mascaramento de FS em ratos, através de anticorpos contra esse fosfolípido, houve subsequentemente inibição do engolfamento de células apoptóticas pelos macrófagos, resultando em inflamação e indução à produção de auto-anticorpos.

Mariat *et al.* (2005), Miyanishi *et al.* (2007), Savill e Gregory (2007), Rodriguez *et al.* (2010), caracterizaram o receptor TIM-4 (Imunoglobulina mucina de células T) como uma das principais proteínas transmembrana

presente em células apresentadoras de antígenos, que se ligam especificamente a FS, cabendo-lhe a função de identificar este fosfolípido e remover o copo apoptótico, além de inibir ações inflamatórias.

Santiago *et al.* (2007) cientes da importância do evento de ligação de FS com os receptores TIM-1 e TIM-4 na captação de células em apoptose, realizaram um estudo determinando, através de processos de cristalização e análise da interação das moléculas, que a porção hidrofílica de FS interage com a região de Sítio de Ligação Dependente de Íon Metálico (MILIBS) no domínio dos receptores TIM-1 e TIM-4 (Figura 5), culminando no engolfamento de células em processo de apoptose, além de destacarem o íon sódio como indispensável no processo de interação entre essas duas moléculas.

Su, Lin e Kane (2008) relataram a importância dos receptores TIM-1 e TIM-3 na regulação imune e salientaram a importância da descoberta da afinidade desses receptores com FS. Meyers *et al.* (2005), Umetsu *et al.* (2008), Freeman *et al.* (2010) caracterizaram os genes da família de receptores TIM (TIM-1, TIM-3 e TIM-4), como cruciais na regulação da imunidade inata e adaptativa. Porém a expressão desses receptores varia de acordo com o tipo celular, sugerindo funções diferenciadas na regulação imune.

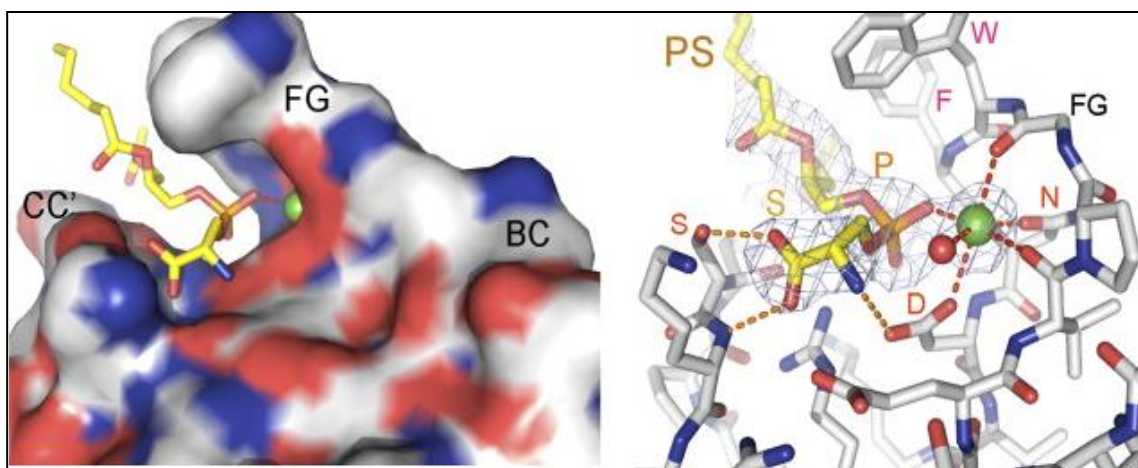


Figura 5 - Interação de FS nas imunoglobulinas TIM-1 e TIM-4 em camundongos. Esta ligação entre o grupo amina hidrofílico de FS e os receptores TIM, é realizada através do MILIBS, onde há dependência de íon de sódio. Os resíduos aromáticos na ponta da cadeia de FG.

Wong *et al.* (2010), demonstraram que o receptor TIM-4 possui papel essencial na manutenção da homeostasia de macrófagos peritoneais, sua deficiência acarreta aumento significativo da população de células peritoneais, amplificando a produção de citocinas como o TNF- α . É necessário salientar

que a deficiência na limpeza de células mortas pode resultar em autoimunidade (HANAYAMA *et al.*, 2004).

Na ilustração (Figura 6) é possível visualizar as principais proteínas e receptores que interagem com FS no evento de engolfamento de células apoptóticas. Há casos em que a ligação entre o receptor FS (rFS) necessite de proteínas intermediárias, no entanto há também receptores que se ligam diretamente a FS.

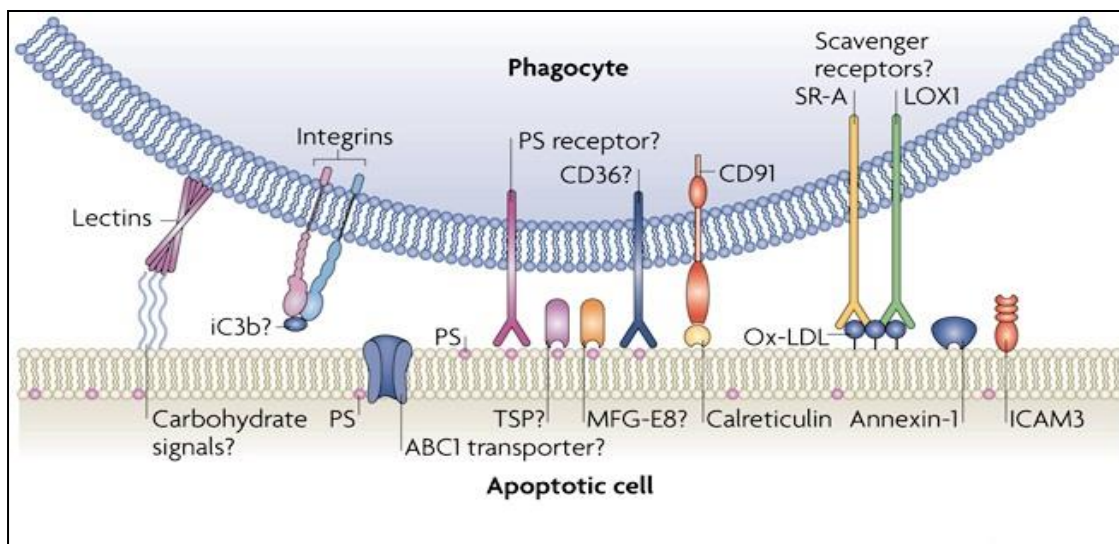


Figura 6 - Receptores de células fagocitárias e proteínas que interagem com FS, caracterizando o evento da apoptose. A interação rFS pode ser direta ou indireta (empregando moléculas secundárias). PS, Fosfatidilserina. Fonte: TAYLOR; CULLEN e MARTIN (2008).

No entanto, não é apenas o organismo que usufrui dos benefícios de FS. Microrganismos mimetizam a exposição de FS para serem engolfados e iniciarem seu processo de infecção em macrófagos, inibindo, sobretudo, óxido nítrico e estimulando TGF- β 1 e IL-10. *Toxoplasma gondii* (SEABRA; DE SOUZA; DAMATTA, 2004), *Leishmania* ssp (WANDERLEY *et al.*, 2005; SHAHA, 2006; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2006), e formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (DAMATTA *et al.*, 2007), frequentemente realizam esta estratégia. Há relatos também de células tumorais que expõem excessivamente FS para promover uma imunossupressão do sistema imune, permitindo seu desenvolvimento sem interferências do organismo (LIMA *et al.*, 2009).

3.3. LIPOSSOMOS: CONCEITO E PROCESSO DE PRODUÇÃO

Lipossomos são vesículas com tamanhos nanométricos, compostas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas similares à membrana plasmática de células mamíferas. A forma cilíndrica convencional dos lipossomos é devido à interação entre às regiões hidrofílicas (afinidade com água) e hidrofóbicas (repulsão a água) dos fosfolipídios em solução aquosa. A estrutura lipossomal conta também com um interior vazio e aquoso (Figura 7). Lipossomos são biodegradáveis e não imunogênicos, permitindo uma ampla aplicabilidade na medicina, além de serem ótimos modelos para a compreensão físico-química de membranas fluidas (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

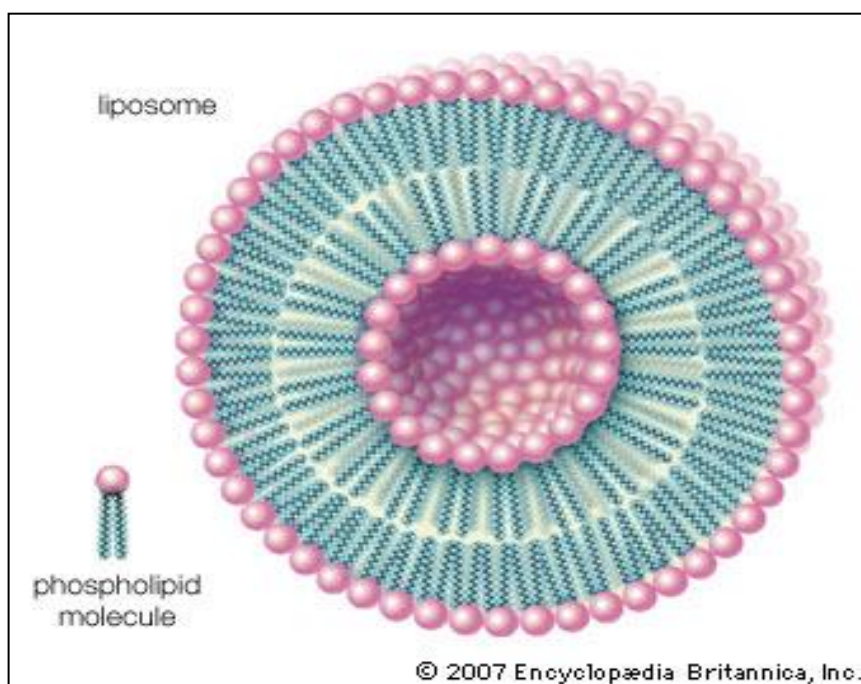


Figura 7 - Estrutura lipossomal convencional. Após exposição em solução aquosa na temperatura de transição, os fosfolipídios rearranjam-se formando uma bicamada cilíndrica convencional. O espaço vazio aquoso permite o encapsulamento de drogas em seu interior. Fonte ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA ONLINE (2007).

Os fosfolipídios empregados para formarem a estrutura lipossomal podem ser sintetizados ou extraídos de compostos orgânicos como soja, cérebro de animais e outras fontes. Fosfatidilserina (FC), fosfatidilglicerol (FG) e fosfatidilserina (FS) são comumente empregados, além de colesterol (CH)

empregado para estabilizar a membrana fluida e reduzir o processo de oxidação (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

O encapsulamento de drogas no interior aquoso lipossomal, permite a entrega de drogas, formando um sistema de liberação lenta e promovendo um tratamento mais eficiente. Lipossomos são empregados para encapsular drogas para o tratamento de diversas doenças como o câncer (DESHPANDE; BISWAS; TORCHILIN, 2013; YANG *et al.*, 2013), tuberculose (ROSADA *et al.*, 2008), leishmaniose visceral (GRADONI; BRYCESON; DESJEUX, 1995), doenças cardiovasculares (LEVCHENKO; HARTNER; TORCHILIN, 2012), servindo também como sistema adjuvante para vacinas (ALVING *et al.*, 2012), empregado também para encapsular anestésicos e material genético como DNA e RNA (CANDIOTTI, 2012; SILVA *et al.*, 2013) dentre outras aplicações.

Além dos lipossomos convencionais são empregados lipossomos com mudanças físico-químicas com diferentes objetivos. Destacam-se os lipossomos furtivos (conjugação de polietileno glicol), imunolipossomos (conjugação de anticorpos), lipossomos carreadores de proteínas, peptídeos, virossomos e lipossomos polimórficos (sensíveis ao pH, termo-sensíveis e catiônicos) (RAI *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2013; INOH *et al.*, 2013; MOSER *et al.*, 2013).

O processo de produção de lipossomos possui etapas fundamentais como a) formação de filme lipídico, após os lipídios serem dissolvidos em solvente orgânico e evaporados, b) hidratação do filme lipídico através de uma solução aquosa ou tampão em agitação contínua que resultará na formação de lipossomos multilamelares heterogêneos (nesta solução o fármaco estará disperso) em temperatura de transição que repercutirá na fluidez da membrana e no arranjo dos fosfolipídios, c) formação de tamanhos e lamelas homogêneas (MLVs, grandes vesículas multilamelares; LUVs, grandes vesículas unilamelares e SUVs, pequenas vesículas unilamelares) através de sonicação ou extrusão (sistema de pressão onde as vesículas passam através de uma membrana de tamanho específico) formando assim, os lipossomos de acordo com o tamanho desejado, d) purificação, e) dados analíticos como o tamanho dos lipossomos, potencial zeta, agregação, oxidação, hidrólise e eficiência de encapsulamento, f) opcionalmente é possível realizar a liofilização dos

lipossomos para longos períodos de armazenamento ou realizar a estocagem em solução tampão (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

A estabilidade lipossomal também é importante e possui estreita relação com pH, osmolaridade e principalmente com o processo de hidrólise e oxidação (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

O Processo de hidrólise e oxidação tornam os lipossomos instáveis em solução aquosa (SABÍN *et al.*, 2006).

A oxidação, particularmente nos lipossomos, é um evento comum na composição lipossomal em solução aquosa. Esta variável repercute diretamente no efeito desejado dos lipossomos (MOSCA; CEGLIE; AMBROSONE, 2011).

A oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídios resulta na formação de hidroperóxidos, formando dienos conjugados, que são absorvidos em 235 nm. Este evento pode fornecer dados importantes que determinem a presença de oxidação em uma determinada solução lipossomal (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

3.4. LIPOSSOMOS FS: APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Novas abordagens utilizando lipossomos demonstram uma quebra no paradigma terapêutico, na qual o emprego de lipossomos era quase que exclusivamente relacionado com o encapsulamento, entrega e sistema de liberação de drogas.

No entanto, com a função de FS bem definida no processo apoptótico, o uso de lipossomos constituídos de FS (LFS), tem sido avaliado na última década. O objetivo é mimetizar o evento apoptótico e com isso promover a redução do processo inflamatório em modelos de artrite experimental, em processo inflamatório instaurando *in vivo* e *in vitro*, além de outros modelos experimentais.

O estudo pioneiro de Huynh, Fadok e Henson (2002) com LFS, demonstrou que o processo inflamatório peritoneal em camundongos estimulado por tioglicolato, foi inibido após a administração de células

apoptóticas e LFS, sendo esta ação relacionada diretamente com o aumento significativo de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β).

Hoffmann *et al.* (2005), estudaram a relação de FS com seus receptores e relataram após estudos clínicos que a adição de LFS inibiu significativamente a resposta imune adaptativa, representada principalmente por células T CD4+. Tal fato foi embasado por observar um aumento na produção de TGF- β , citocina anti-inflamatória que inibe células CD4+, após a administração dos lipossomos. No entanto, foi verificado pelos mesmos no estudo *in vitro* com células dendríticas derivadas da medula óssea, que LFS não inibiu a resposta pró-inflamatória. Os mesmos levantaram a hipótese que a resposta poderia estar nos rFS que são expressos na superfície de uma variedade de células encontradas no tecido periférico, incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e macrófagos e sua ausência em células derivadas da medula óssea e células dendríticas utilizadas no estudo *in vitro*.

Ramos *et al.* (2007) observaram que LFS reduziu o edema da pata de camundongos induzido com carragenina. As administrações intraperitoneais (i.p.) na concentração de 100 mg/kg, foram eficientes na redução do edema, após oito horas da administração. Também demonstraram que esta ação é dependente de Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Wu *et al.* (2010) obtiveram resultados satisfatórios ao realizar a administração de LFS em modelo agudo e crônico. Segundo o estudo, houve uma significativa inibição da diferenciação de osteoclastos e diminuição da perda óssea devido a mimetização apoptótica e anti-inflamatória de LFS. Supostamente essa ação de LFS tenha relação com o aumento significativo dos níveis plasmáticos de TGF- β 1 e Prostaglandina (PGE2 - estimula osteoblastos na liberação de fatores que estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos).

Ma, Wu e Nakanishi (2011), ratificaram a ação anti-inflamatória de LFS em experimento semelhantes e observaram também *in vitro* a redução da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias.

Recentes pesquisas demonstram que além da ação anti-inflamatória, LFS podem ser empregados para reduzir a imunogenicidade de moléculas

recombinantes (RAMANI *et al.*, 2008a; RAMANI *et al.*, 2008b; GAITONDE *et al.*, 2011).

A proteína Fator VIII recombinante humana, empregada na hemofilia A, demonstrou que possui uma região em sua estrutura que possibilita a agregação de proteínas, aumentando a imunogenicidade. Tal região é utilizada para ligação com lipídios (RAMANI *et al.*, 2008a).

Ramani *et al.* (2008a) cientes do contexto imunogênico da proteína recombinante, realizaram administrações de LFS para entregar o Fator VIII recombinante humano contra a Hemofilia A em camundongos. Os resultados demonstraram claramente que as administrações de LFS reduziram a produção sérica de anticorpos neutralizantes contra o Fator VIII recombinante humano. No entanto, o período de circulação dos lipossomos era curto, sendo estes absorvidos rapidamente pelo sistema reticuloendotelial (SRE). Ramani *et al.* (2008b), no mesmo ano, realizaram uma nova pesquisa empregando LFS peguilados para administração do Fator VIII recombinante humano da hemofilia A. Os resultados foram promissores, e destacaram que além de aumentar o tempo de circulação dos lipossomos, houve uma significativa redução de imunogenicidade da molécula Fator VIII em camundongos. Os resultados de Ramani *et al.* (2008b), concordaram com os achados de Hoffmann *et al.* (2005) que relacionaram o aumento de TGF- β 1 com a ação de LFS, na qual inibiu células CD4+. Este fato pode ter relação direta com a redução da imunogenicidade.

No mesmo segmento, Gaitonde *et al.* (2011), avaliaram o mecanismo de ação de LFS com o Fator VIII recombinante humano contra a Hemofilia A, e demonstraram que houve uma redução significativa da produção de anticorpos neutralizantes contra a estrutura da molécula recombinante em camundongos. Os mesmos sinalizam a redução da imunogenicidade da molécula pelo fato de FS regular a maturação de células dendríticas, além de promover o aumento sérico de TGF- β 1 e IL-10 e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Com relação à presença de Peg na estrutura de LFS, Geelen *et al.* (2012) demonstraram que a inclusão de 5% mol de Peg não afeta a interação entre os macrófagos e FS. Essa estratégia viabiliza prolongar o tempo de circulação dos lipossomos reduzindo o engolfamento SER. O aumento do tempo de circulação permite, que a droga tenha ação além da região

subcutânea, pois lipossomos com diâmetros de 100 nm se infiltram e adentram na corrente sanguínea (GRANT; BANSINATH, 2001), promovendo um efeito sistêmico em outras regiões. Também reduz a captura de LFS por células não especializadas e absorção dos lipossomos pelo fígado e baço aumentando a concentração no local inflamado devido ao aumento do Efeito de retenção e permeabilidade (EPR) (VAN DEN HOVEN *et al.*, 2011).

Na Tabela 1 são apresentadas as principais pesquisas relacionadas com LFS na última década, demonstrando um interesse crescente nesta nova terapia que pode regular o sistema imune, proporcionando benefícios em diversas enfermidades.

Tabela 1 – Perfil dos estudos com LFS nos últimos anos

Referência Autor/Ano	Composição (fração molar)	Metodologia
Huynh, Fadok, Henson (2002)	FC:FS (?)	Cam. ICR/Inflamação peritoneal Tgl 1,5 mL/inflamação pulmonar LPS (20 µg em 100 µl SN) 10 µM LFS /10 ⁶ células, M ϕ 10 µM LFS /10 ⁶ células
Hoffmann <i>et al.</i> , 2005	FC:FS:CH (30:30:40)	CamRaw/Artrite – Adjuvante (5 mg/kg/dia/i.p.). DC - Ativ. LPS (100 ng/mL)
Ramos <i>et al.</i> , 2007	FC:FS (7:3)	Cam/Artrite – carragenina (100 mg/kg/8h, pós indução/i.p.)
Ramani <i>et al.</i> , 2008a	FC:FS (7:3)	Cam/ Hemofilia
Ramani <i>et al.</i> , 2008b	FC:FS:Peg (7:3)	Cam/ Hemofilia
Dvorientchikova <i>et al.</i> , 2009	FC:FS (7:3)	Cam C57BL/6/ Isquemia de retina (0.5 mg/24h/i.p.)
WU <i>et al.</i> , 2010	FC:FS (7:3)	RatLewis/Artrite – CFA (5 mg/kg/dia/i.m.)
Harel-Adar <i>et al.</i> , 2011	FC:FS:CH (1:1:1,33)	CamBalb/c/ Infarto do Miocárdio agudo (0,03 M/ I.M)
Ma, Wu, Nakanish 2011	FC:FS (7:3)	RatLewis/Artrite – CFA. M ϕ - Est. LPS (10 ng/mL) (5 mg/kg/dia/i.m.)
Gaitonde <i>et al.</i> , 2011	FC:FS (7:3)	Hemofilia (i.v.)
Geelen <i>et al.</i> , 2012	FC:FS:DSPE- PEG ₂₀₀₀ (60:6:2)	Avaliação das rotas de entrega de drogas encapsuladas

Cam, camundongo; Rat, rato; DC, células dendríticas; Tgl, Tioglicolato; LPS, lipopolissacarídeo; CH, colesterol; FC, fosfatidilcolina; PEG, Polietileno Glicol; M ϕ , macrófagos; CFA, Adjuvante completo de Freund; SN, Soro normal; Est, estimulado; (?), concentração molar desconhecida; i.v., intravenosa, s.c. subcutânea; I.M., intramiocárdica; i.p., intraperitoneal; DSPE, 1,2-diésterol-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina; ICR, região de controle de impressão.

Os principais estudos que empregaram LFS em modelo experimental de artrite, avaliaram o seu efeito em modelos de artrite aguda (HOFFMANN *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2010; MA; WU; NAKANISHI, 2011). A facilidade da avaliação de drogas pelo modelo de artrite aguda se tem pelo curto tempo em que o animal inicia o processo inflamatório, sendo o mais comumente utilizado para a avaliação e validação de moléculas antirreumáticas. Em modelos AA existe uma dependência exclusiva da ação das células T no desenvolvimento da artrite. A CIA, por sua vez, é um modelo que se aproxima das condições da AR em humanos. O emprego de células T é importante para o processo, no entanto parece que as células B e os anticorpos anti-colágeno possuem papel fundamental na patogenia da artrite por CIA (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007). A escolha do modelo CIA em detrimento de modelos agudos deve-se pela ausência de estudos empregando LFS neste modelo, além de avaliar o efeito de LFS sobre outras rotas promotoras da artrite experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÉTICA EXPERIMENTAL

O Projeto foi submetido e aprovado pelo Conselho de Ética do Hospital das Clínicas de Porto Alegre/RS, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Anexo I). O Estudo obedeceu a Legislação Brasileira e o Código Estadual de Proteção aos Animais, (Lei 11.794/2008), com políticas locais no cuidado e uso de acordo com os códigos relacionados à prática experimental. Os animais foram anestesiados tanto para a indução da artrite quanto para a eutanásia.

Os experimentos *in vivo* foram realizados no laboratório de doenças autoimunes e infecciosas vinculado ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS, departamento de Experimentação Animal vinculado à UFRGS. Foram empregados 24 camundongos isogênicos machos (DBA/1J) com 8-12 semanas, cedidos pelo Biotério do Hospital das Clínicas de Porto Alegre/RS.

4.2. LIPOSSOMOS

Os lipossomos foram adquiridos da *Encapsula Nanoscience* (Nashville, TN, USA), com diâmetros em torno de 100 nm, constituídos por Fosfatidilcolina (FC), FS e *1,2-diesterol-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-(polietilenoglicol)-2000* (DSPE-Peg2000), numa razão molar de 68:30:2, respectivamente.

Os fosfolipídios foram adicionados nas razões molares desejadas em clorofórmio/metanol (90:10) e posteriormente foram secados numa atmosfera de nitrogênio. A seguir foram ressuspensos em PBS (pH 7,4) na temperatura de transição dos fosfolipídios e submetidos a um extrusor

com membrana porosa de policarbonato, medindo cerca de 100 nm. A suspensão foi passada na membrana 11 vezes até a formação de lipossomos unilamelares com diâmetros de 100 nm (*Zetasizer Nano ZS90, Malvern, Westborough, MA, USA*). Os lipossomos foram estocados em PBS pH 7,4 desgaseificado, a 4°C e purgados com argônio até seu uso.

4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS

Para avaliar a ocorrência de oxidação na solução de LPeg-FS estocado em solução PBS pH 7,4 a 4°C, as amostras foram submetidas a coluna C8 (Kinetex, 100 x 2.1 mm, 2.6 µm) eluída em modo isocrático com 90% de metanol: 5 mM acetato de amônio e fluxo de 0,14 mL/min em CLAE (Shimadzu HPLC LC-2010AHT, Japão).

O volume de 100 µL do estoque de LPeg-FS foi extraído com 200 µL de clorofórmio:metanol 2:1. A fase orgânica foi coletada, seca em nitrogênio e ressuspendida em 100 µL de metanol. O volume injetado na coluna foi de 2 µL da amostra extraída. A detecção do analito foi realizada em 205 nm e 235 nm.

4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

O experimento *in vivo* foi dividido em quatro grupos experimentais (n=24):

- a) Artrite induzida por colágeno (CIA) + veículo do tratamento (salina 0.9%) (n=6);
- b) CIA + tratamento LPeg-FS (5 mg/kg, subcutânea – s.c.) (n=6);
- c) CIA + tratamento com LPeg-FS (10 mg/kg, s.c.) (n=6);
- d) CIA + tratamento com LPeg-FS (15 mg/kg, s.c.) (n=6);

As doses utilizadas neste trabalho foram empregadas com base em estudos utilizando LFS em modelo de artropatia inflamatória aguda (WU *et*

al., 2010; MA; WU; NAKANISHI, 2011). O volume aplicado via s.c. foi de 100 μ L na região do pescoço, diariamente por 20 dias a partir do *booster*. O volume das administrações foi o mesmo, no entanto a concentração de LPeg-FS variou de acordo com o grupo experimental.

4.5. PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS COM COLÁGENO BOVINO TIPO II (MODELO DE POLIARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO)

A Poliartrite por CIA em camundongos foi realizada segundo metodologia proposta por Brand, Latham e Rosloniec (2007).

O Colágeno bovino tipo II (CII) foi dissolvido em 0,1 M de ácido acético a 4°C por 12h (2 mg/mL). Utilizou-se o adjuvante completo de Freund's (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) com uma concentração de 1 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*. Para aumentar a concentração de *M. tuberculosis*, o adjuvante foi suplementado para 4 mg/mL da bactéria inativada (linhagem H37RA, Difco, Detroit, MI, USA).

Usualmente o CFA comercial possui uma concentração de 1 mg/mL. No entanto para uma maior incidência da doença, empregou-se a concentração de 4 mg/mL de *M. tuberculosis* (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

O CII (2 mg/mL) e CFA (4 mg/mL) foram misturados em volumes iguais para formar a emulsão.

A CIA foi induzida por CII no dia zero, com imunização intradérmica (i.d.) de 50 μ L de emulsão na base da cauda. No 18° dia, os camundongos receberam o *booster* em outro ponto da cauda, seguindo o mesmo protocolo, mas com adjuvante incompleto de Freund (IFA), i.d. Para as imunizações, os animais foram expostos à inalação do anestésico isoflurano (1 mL/mL, Abbott, Chicago, IL, USA).

Os tratamentos com LPeg-FS 5, 10 e 15 mg/kg/dia, foram iniciados no mesmo dia do *booster*.

Por fim, após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os joelhos foram seccionados e preservados à temperatura de -80°C para análise das citocinas articulares.

4.6. ESCORE CLÍNICO, INCIDÊNCIA E PESO DOS ANIMAIS

A análise subjetiva do escore clínico de gravidade, nos animais durante o período de tratamento, foi realizada por examinadores cegados. Foi avaliado o grau de inchaço das patas anteriores e posteriores dos animais, por meio de uma escala de 1 a 4 para cada membro. Para avaliar a progressão da doença em um animal, empregou-se a escala de 0 a 16, ou seja, realizou-se o somatório do escore de todos os membros do animal (Tabela 2).

TABELA 2 – ESCORE PARA AVALIAÇÃO SUBJETIVA DA ARTRITE NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Escore de gravidade	Grau de Inflamação
0	Sem sinais de eritema ou edema
1	Eritema e edema leve (tarsos ou metatarsos)
2	Eritema e edema moderado (tarsos e metatarsos ou tarsos e tornozelo)
3	Eritema e edema severo (metatarsos a tornozelo)
4	Todas as articulações afetadas com perda da função (anquilose), a partir do início da doença.

A cada três dias os animais foram pesados para avaliação de ganho ou perda de peso. A incidência da doença foi avaliada através do escore clínico, considerando 100% de acometimento quando todos os animais de um determinado grupo experimental apresentaram no mínimo o escore “1”.

4.7. AÇÃO IMUNOMODULADORA *IN VITRO* DE LPEG-FS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LPS/PMA

A cultura de macrófagos (RAW 264.7 - ATCC® TIB-71™) foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco®) contendo 4500 mg glicose/L, L-glutamina e vermelho de fenol à 37°C e 5% de CO₂. O meio foi suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) e penicilina 1U/mL e estreptomicina 1 µg/mL. As células foram cultivadas em placas de culturas de 96 poços com densidade celular de 5x10⁴ por poço.

Os macrófagos foram estimulados com 100 ng/mL de LPS (Linhagem *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e 10 ng/mL de acetato de miristato de forbol (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) por 12 horas antes do tratamento (Tabela 3).

O tratamento com 100 µM de LPeg-FS durou 24 h, após o estímulo de 12 h com LPS/PMA. Após o cultivo, recuperou-se o sobrenadante para dosagem dos níveis das citocinas que foram quantificadas por citometria de fluxo e reação imunoenzimática (ELISA).

TABELA 3 – GRUPOS EXPERIMENTAIS DO ESTUDO *IN VITRO*

	Cultura sem tratamento	PBS (pH 7,4)	LPeg-FS	LPS+PMA	LPS+PMA+PBS	LPS+PMA+LPeg-FS
Dose	-	10 µL	10 µL (100 µM)	100 ng/mL 10 ng/mL	100 ng/mL* 10 ng/mL* 10 µL	100 ng/mL* 10 ng/mL* 10 µL (100 µM)
Regime do tratamento	-	24 h	24 h	12 h	12 h* 24 h	12 h* 24 h

A concentração de 100 µM LPeg-FS teve por base estudos similares realizados por Huynh, Fadok e Henson (2002), Hoffmann *et al.* (2005) e Ma, Wu e Nakanishi (2011), após validação por curva de concentração otimizada.

4.8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1 β E TGF- β 1 POR REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA (ELISA)

Para a quantificação da IL-1 β foi empregado o *kit Mouse IL-1 β ELISA Set* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Para análise dos níveis de TGF- β 1, foi utilizado o *kit Mouse TGF- β 1 Platinum ELISA* (eBioscience, San Diego, CA, USA).

Para avaliar a produção de IL-1 β e TGF- β 1 no estudo *in vivo*, as articulações dos joelhos dos animais foram homogeneizadas pelo Polytron homogenizer (Kinematica Inc.) a 4°C com PBS (pH 7,4) estéril contendo inibidor de protease (*Protease Inhibitor Cocktail* – n° P1860, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min. (OLIVEIRA *et al.*, 2011). O sobrenadante foi colhido para análise.

Para avaliar a produção de IL-1 β e TGF- β 1 no experimento *in vitro*, os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram colhidos após o término do tratamento e empregados no ensaio. A metodologia dos kits seguiu as especificações dos fabricantes dos *kits*.

O limite de detecção de IL-1 β foi de 15,6 pg/mL enquanto que de TGF- β 1 foi de 31,3 pg/mL.

4.9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A E IL-10 POR CITOMETRIA DE FLUXO

As concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-10 foram dosadas, do macerado das articulações dos joelhos dos animais do estudo *in vivo* e do sobrenadante das culturas de macrófagos do experimento *in vitro* (idem 4.8) pelo *kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). Os dados foram obtidos no citômetro de fluxo BD *FACSCalibur* e analisados pelo *software FCAP3.0™* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA).

Os limites de detecção das respectivas citocinas foram:

IL-2 0,1 pg/mL, IL-4 0,03 pg/mL, IL-6 1,4 pg/mL, IFN- γ 0,5 pg/mL, TNF- α 0,9 pg/mL, IL-17A 0,8 pg/mL e IL-10 16,8 pg/mL.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação do escore clínico, a comparação dos grupos foi obtida por um modelo não linear, empregando o *software* R (*R Project for Statistical Computing* – Universidade Federal do Paraná), com a seguinte fórmula:

$$\frac{A}{1 + e^{-(x-x_0)/5}}$$

Onde:

A = Assíntota

-(x-x₀)/5 = Meia-vida

5 = Escala

Os resultados foram descritos por *valor*, *erro padrão*, *t-valor* e *p-valor* ($\leq 0,05$).

Para avaliar a relação entre a produção de citocinas e interleucinas nos grupos experimentais *in vivo* e *in vitro*, foi empregado o teste de normalidade e posteriormente o *teste-t*. Os dados quantitativos gerados foram descritos por média e erro médio padrão (SEM), considerado *p-valor* $\leq 0,05$. Foi utilizado o *software GraphPad Pris* versão 5.03 para o sistema operacional Windows (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*).

5. RESULTADOS

5.1. A SOLUÇÃO DE LPEG-FS APRESENTOU PRODUTOS OXIDADOS DE FOSFOLIPÍDIOS

A solução estoque de LPeg-FS, empregada no estudo *in vivo* e *in vitro* apresentou produtos oxidados de FC. Os produtos foram absorvidos no comprimento de onda 235 nm, neste comprimento de onda são detectados os produtos de oxidação de ácidos graxos contendo dienos conjugados (Fig. 8).

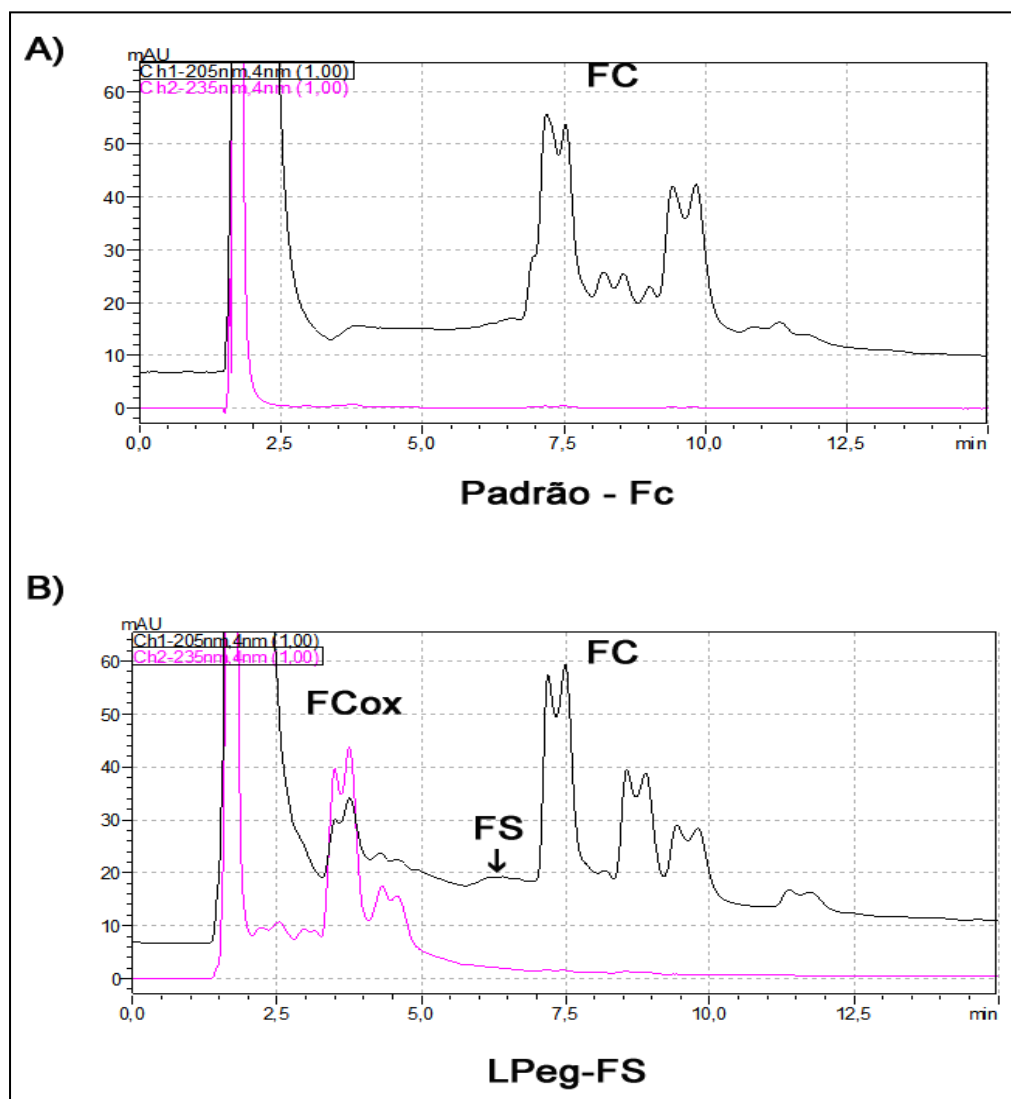


Figura 8 – Análise de produtos oxidados por CLAE. A) O padrão FC é absorvido em 205 nm (—), não houve a absorção em 235 nm (—) demonstrando a ausência de produtos oxidados. B) FCox são os produtos de oxidação de FC absorvidos em 235 nm. FS e FC foram absorvidos.

Nota-se que no padrão com FC não oxidado (Figura 7A), não há qualquer pico de absorção no comprimento de onda 235 nm, enquanto que na alíquota da amostra de Lpeg-FS (Figura 7B), há diversos picos absorvidos no comprimento 235 nm, demonstrando a presença de dienos conjugados na amostra lipossomal.

5.2. ANIMAIS TRATADOS COM LPEG-FS 5 mg/kg NÃO APRESENTARAM O ESTÁGIO AVANÇADO DA DOENÇA

Considerando o período de tratamento (20 dias) e as administrações diárias de 5, 10 e 15 mg/kg de LPeg-FS, os resultados não demonstraram significância entre os grupos de tratamento 10 e 15 mg/kg e o grupo controle quanto a redução da progressão da doença avaliada pela assíntota.

A Figura 9 demonstra a dinâmica da progressão da doença a partir da avaliação do escore clínico diário. A trajetória de cada indivíduo é apresentada através dos pontos, durante o período de tratamento, e demonstrou certa heterogeneidade na linhagem de camundongos DBA/1J, empregada no estudo.

Já o grupo tratado com LPeg-FS 5 mg/kg apresentou uma assíntota superior significativa, ou seja, os animais do grupo tratado com 5 mg/kg não apresentaram maior grau de gravidade da doença em comparação ao controle (Figura 9 e Tabela 4). Dois dos seis animais desse grupo apresentaram desenvolvimento da doença tardia, um no 7º dia após o *booster* o outro animal apenas no 13º dia, impactando na incidência (Figura 10) e no valor da assíntota superior do escore (Tabela 4). A incidência da doença foi de 100%, demonstrando uma forte indução da doença. No 14º dia após o *booster*, todos os animais estavam acometidos da doença.

O coeficiente tempo de meia-vida, considerando o tempo levado pelos grupos experimentais em apresentar escore elevado da doença na metade do tempo experimental total, demonstrou que o tratamento 15 mg/kg obteve rapidamente um elevado escore em relação ao controle (Tabela 4). O coeficiente escala, que avalia a inclinação da curva não detectou significância entre os tratamentos e o controle.

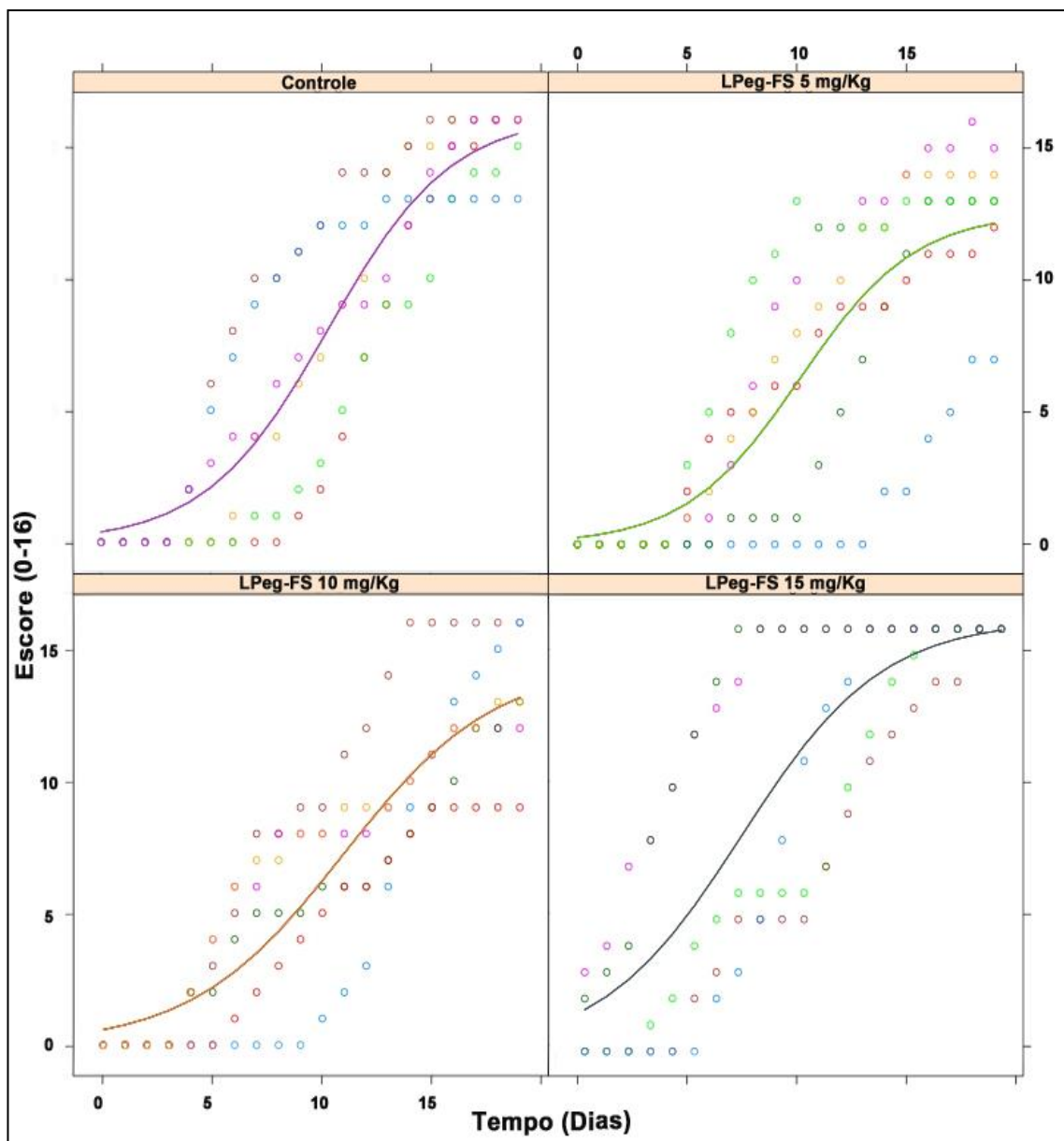


Figura 9 – Avaliação do escore por modelo estatístico não linear. Esse modelo permite avaliar a variabilidade dentro dos grupos tratados em relação ao controle. Cada grupo de pontos com a mesma coloração determina a trajetória de um animal no período do tratamento.

O grupo tratado com 15 mg/kg apresentou dois animais com a doença no primeiro dia do *booster* (Figura 10) e um animal foi a óbito no segundo dia após o *booster*, comprometendo estatisticamente o grupo.

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ESCORE CLÍNICO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Coeficientes	Valor	Erro padrão	t-valor	p-valor
A. (Intercepta)				
Controle	16.175545	1.0711332	15.101338	-
A. 5 mg/kg	3.605808	1.4348796	2.512969	0.0123*
A.10 mg/kg	-1.744312	1.8930081	-0.921450	0.3573
A.15 mg/kg †	0.171912	1.3791471	0.124651	0.9009
MED. (Intercepta)				
Controle	10.371630	0.6007184	17.265378	-
MED. 5 mg/kg	-0.213970	0.9060709	-0.236152	0.8134
MED. 10 mg/kg	0.582835	1.2181006	0.478479	0.6325
MED. 15 mg/kg †	-3.209696	0.8427590	-3.808557	0.0002**
S. (Intercepta)				
Controle	2.798275	0.4207555	6.650596	-
S. 5mg/kg	-0.180440	0.6498609	-0.277659	0.7814
S. 10 mg/kg	0.649086	0.7657013	0.847701	0.3971
S.15 mg/kg †	0.402447	0.6458333	0.623143	0.5335

A, assíntota; MED, meia-vida; S, escala; †, óbito; P-valor $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***)

Com relação a perda ou ganho de peso, os animais submetidos ao tratamento não apresentaram ganho de peso significativo com relação ao grupo controle.

Entre o 17° e 20° dia de tratamento, o grupo LPeg-FS 5 mg/kg apresentou aumento de peso, mas não significativo. Os demais grupos de tratamento 10 e 15 mg/kg também obtiveram um aumento do peso, no entanto sem significância (Figura 11).

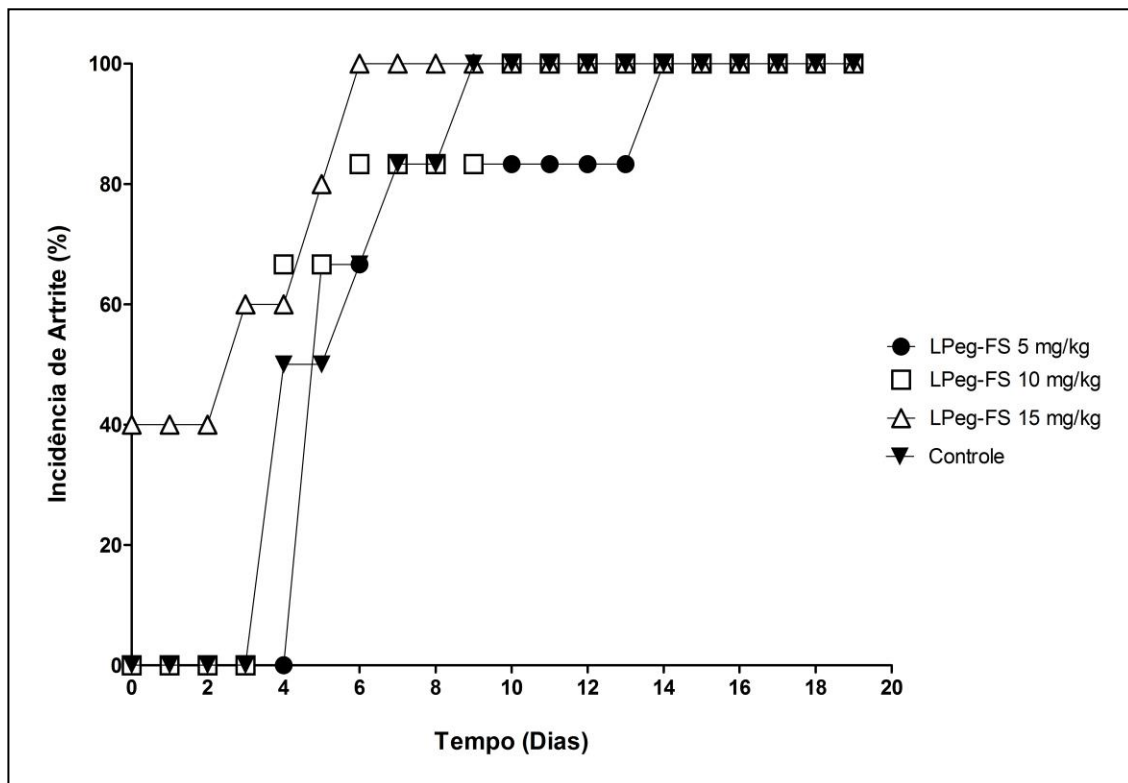


Figura 11 - Incidência da doença nos grupos experimentais. A avaliação da incidência se iniciou no mesmo dia do booster e durante os 20 dias de tratamentos.

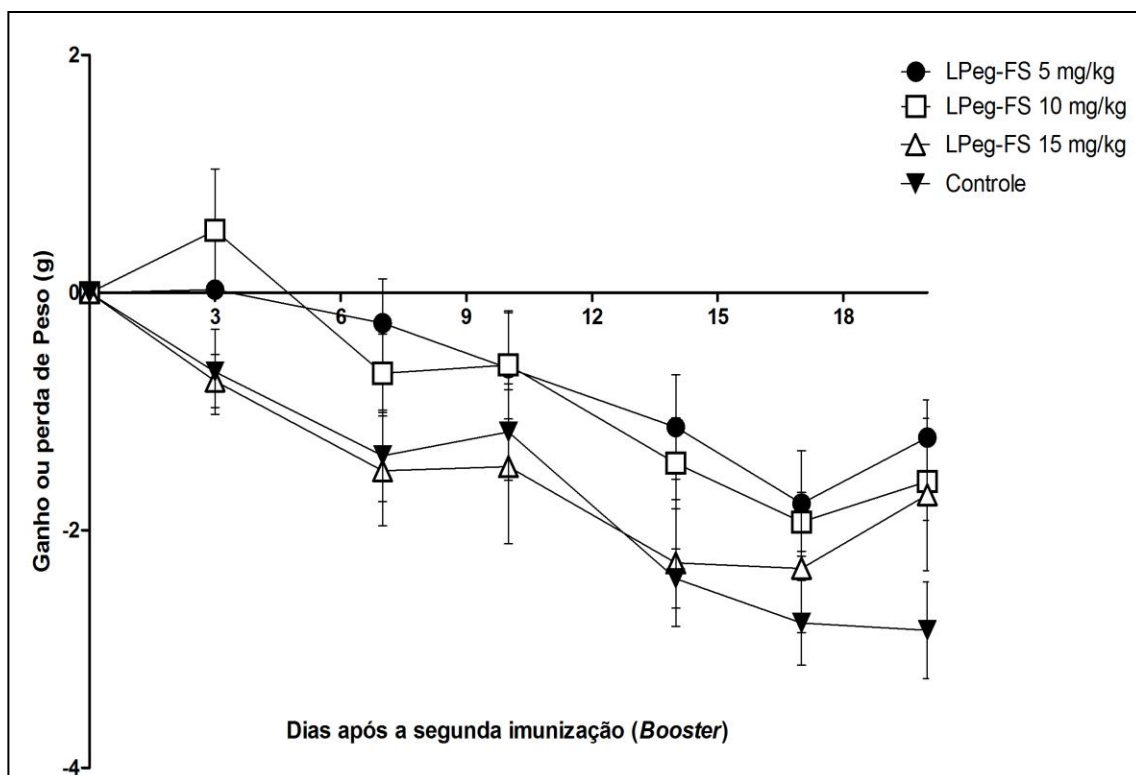


Figura 10 - Avaliação de ganho ou perda de peso dos animais no período de tratamento. Os grupos tratados com LPeg-FS não apresentaram ganho de peso significativo em relação ao controle. Os dados foram descritos por SEM, empregando o teste de normalidade e teste-t.

5.3. NÍVEIS DE TNF- α , IL-6, IL-2 E IFN- γ NAS ARTICULAÇÕES DOS JOELHOS DOS ANIMAIS FORAM REDUZIDOS NOS GRUPOS TRATADOS COM 15 E 10 mg/kg SEM APARENTE RELAÇÃO COM TGF- β 1.

Sobrepondo-se ao escore clínico, a concentração de TNF- α nas articulações dos joelhos dos animais, após o término do experimento, foi significativamente reduzida no grupo tratado com LPeg-FS 10 mg/kg (Figura 12). No entanto esta concentração não apresentou redução de IL-1 β , IL-2, IL-6 e IFN- γ comparado com o controle.

Enquanto que o grupo 15 mg/kg, apresentou redução significativa dos níveis de IL-6, IL-2 e IFN- γ , mas não reduziu IL- β 1 e TNF- α significativamente (Tabela 5).

O grupo LPeg-FS 5 mg/kg não apresentou significância quanto a redução dos níveis de citocinas.

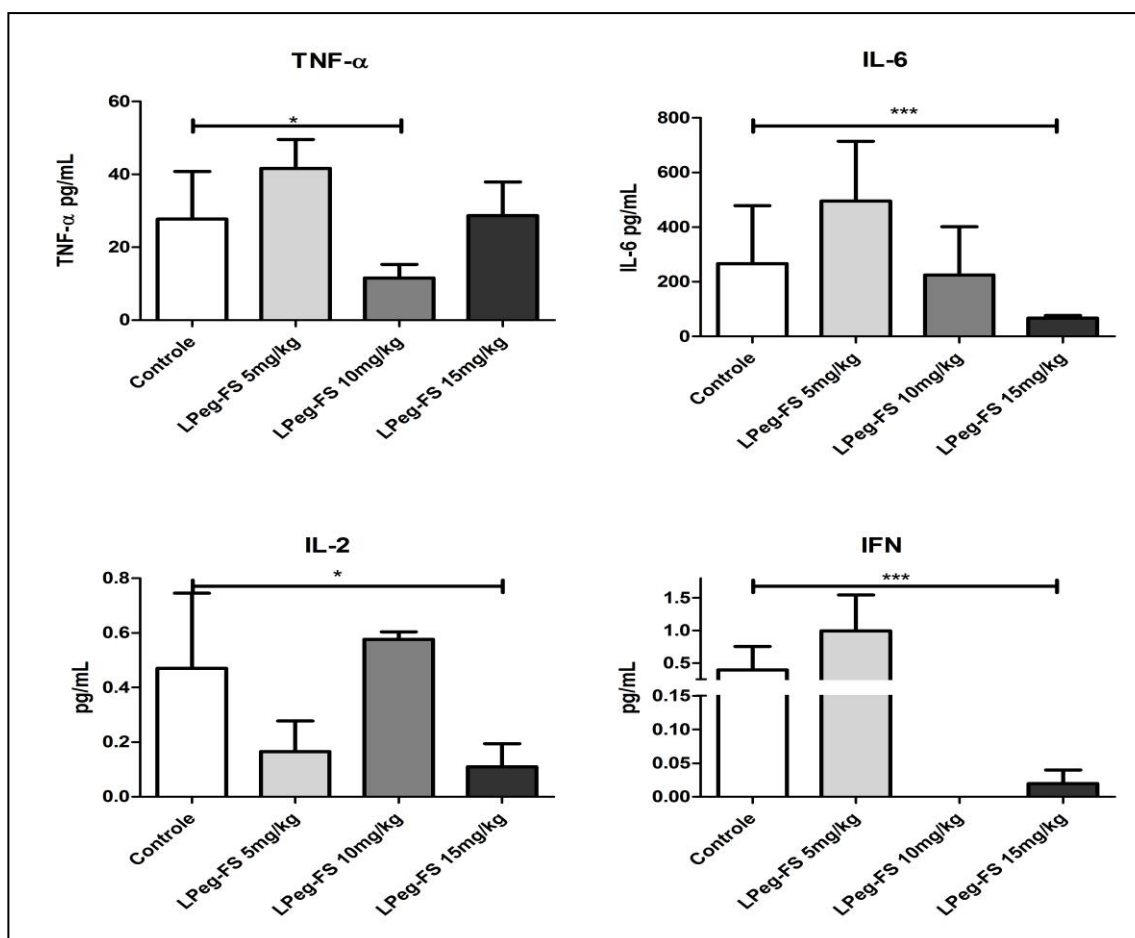


Figura 12 - Quantificação de TNF- α , IL-6, IL-2 e IFN- γ dos joelhos dos camundongos por citometria de fluxo. Os dados foram descritos por SEM, empregando o teste de normalidade e teste-t. P-valor $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***)

As concentrações de IL-17 e IL-10 não apresentaram níveis detectáveis. A citocina IL-4 não apresentou produção significativa (Tabela 5).

Os níveis TGF- β 1 nos grupos tratados com LPeg-FS não apresentaram significância em relação ao controle.

TABELA 5 – EFEITO DE LPEG-FS NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NAS ARTICULAÇÕES DOS JOELHOS DOS CAMUNDONGOS COM ARTRITE INDUZIDA POR CII.

Citocinas (pg/mL)	Tratamento			
	0.9% solução salina (n=6)	LPeg-FS 5 mg/kg (n=6)	LPeg-FS 10 mg/kg (n=6)	LPeg-FS 15 mg/kg (n=6) †
TNF- α	27,72 \pm 13,09	41,62 \pm 7,950	11,58 \pm 3,750 *	28,70 \pm 9,223
IL-2	0,4704 \pm 0,2747	0,1657 \pm 0,1113	0,5763 \pm 0,02736	0,1096 \pm 0,08498*
IL_4	0,6579 \pm 0,1483	0,5791 \pm 0,1225	0,9211 \pm 0,03585**	0,5689 \pm 0,04109*
IL-6	267,3 \pm 211,8	495,6 \pm 218,9	225,2 \pm 176,2	66,95 \pm 10,25***
IFN- γ	0,3932 \pm 0,3622	0,9935 \pm 0,5515	0,00	0,01998 \pm 0,01987***
IL-17	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-
IL-1 β	482,3 \pm 184,0	521,1 \pm 210,8	284,3 \pm 103,8	368,3 \pm 60,41
TGF- β 1	33754 \pm 5659	33625 \pm 1933	33796 \pm 2762	29325 \pm 3384

Os dados apresentados são descritos por média \pm SEM empregando o teste de normalidade e teste-t. A quantificação foi realizada após 20 dias de tratamento, através da homogeneização das articulações dos animais. *, significância; †, óbito. A significância esta relacionada a comparação com o grupo controle (0.9% de solução salina).

5.4. AVALIAÇÃO DE TNF- α E IL-6 EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS/PMA

Nos experimentos *in vitro* empregando macrófagos (RAW 264.7) não houve redução de TNF- α e IL-6 na cultura estimulada com LPS/PMA quando tratada com LPeg-FS 100 μ M (Figura 13 e Tabela 6).

A análise feita por citometria de fluxo, não permitiu detectar IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17 e IL-10. Métodos mais sensíveis deverão ser utilizados para essa avaliação. Os macrófagos apresentaram níveis basais elevados de TNF- α (cultura sem tratamento, PBS e LPeg-FS). Enquanto que os grupos estimulados com LPS/PMA apresentaram concentrações elevadas de TNF- α e níveis exacerbados de IL-6. O grupo tratado com LPeg-FS não apresentou redução da produção de IL-6 e TNF- α .

TABELA 6 - EFEITO DE LPEG-FS NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM CULTURA DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS/PMA.

Citocinas (pg/mL)	Tratamento					
	Cultura sem tratamento	PBS	LPeg-FS 100 μ M	LPS+PMA 100 ng/mL 10 ng/mL	LPS+PMA+ PBS	LPS+PMA+ LPeg-FS
TNF- α	1221 \pm 133,0	1009 \pm 122	832,7 \pm 47,01	2078 \pm 42,38	2777 \pm 53,24	2712 \pm 44,28
IL-6	0,00	0,00	0,00	13878 \pm 406,7	13476 \pm 385,6	12386 \pm 450,8
IL-1 β	109,7 \pm 24,8	84,8 \pm 30,4	84,42 \pm 34,68	556,5 \pm 22,27	537,8 \pm 11,31	543,3 \pm 14,92
TGF- β	10,52 \pm 3,72	16,8 \pm 2,06	21,37 \pm 3,534	12,58 \pm 3,794	18,21 \pm 2,453	18,35 \pm 1,603

Os dados apresentados são descritos por média \pm SEM empregando o teste de normalidade e teste-t. *P*-valor \leq 0,05. A quantificação foi realizada após 24 horas de tratamento.

A concentração de IL-1 β no grupo tratado com LPeg-FS não apresentou redução significativa em comparação ao grupo estimulado e tratado com PBS.

A produção de TGF- β 1 não apresentou significância ao comparar o grupo estimulado com LPS/PMA e tratado com LPeg-FS e o grupo estimulado com LPS/PMA/PBS.

Mesmo com produtos oxidados na solução, a concentração de 100 μ M de LPeg-FS não apresentou toxicidade quando administrado sozinho na cultura sem estímulo.

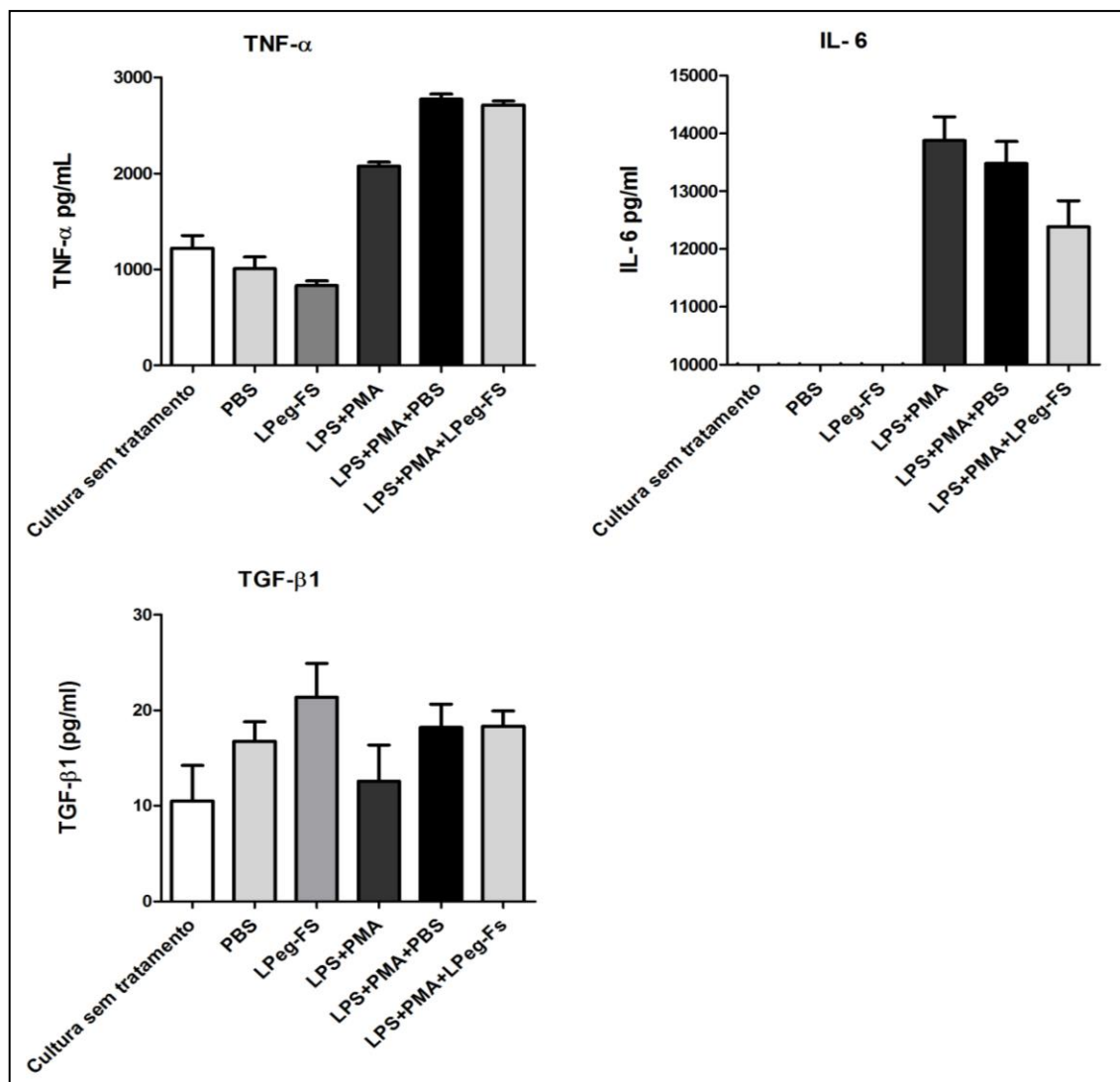


Figura 13 - Quantificação de TNF- α , IL-6 e TGF- β 1 em cultura de macrófagos estimulados com LPS/PMA por citometria de fluxo. Os dados foram descritos por SEM, empregando o teste de normalidade e teste-t. P-valor \leq 0,05 (*), \leq 0,01 (**), \leq 0,001 (***)

6. DISCUSSÃO

A mimetização apoptótica a partir do emprego de LFS tem demonstrado reduzir o processo inflamatório em modelos experimentais de artrite aguda (HOFFMANN *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2007; MA; WU *et al.*, 2010; WU; NAKANISHI, 2011).

O presente trabalho avaliou o efeito de administrações de LPeg-FS diárias em modelo experimental de artrite crônica CIA, através da análise de escore clínico, incidência da doença, peso e níveis de citocinas nas articulações dos joelhos dos animais, além de estudos *in vitro* empregando macrófagos (RAW 264.7 - ATCC[®] TIB-71[™]) estimulados com LPS/PMA.

A avaliação do escore clínico de gravidade (Figura 9 e Tabela 4), permitiu verificar que o grupo 5 mg/kg apresentou significância na assíntota superior nos últimos dias do tratamento. Neste grupo os animais não apresentaram escore 16 como o grupo controle, e nos grupos tratados com LPeg-FS 15 mg/kg e LPeg-FS 10 mg/kg. Dois animais do grupo 5 mg/kg apresentaram desenvolvimento tardio da doença impactando no resultado. Enquanto que os demais, demonstraram uma trajetória similar ao grupo 10 mg/kg. Este último também apresentou apenas dois animais com escore 16. No entanto, os dados do escore clínico não repercutiram nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, no macerado das articulações dos joelhos dos animais, avaliado por citometria de fluxo e ELISA. A incidência da doença (Figura 10) demonstrou que o modelo induziu uma artrite severa, podendo ter impactado nos resultados do experimento.

O grupo tratado com 5 mg/kg, na qual não apresentou animais com escore 16, não demonstrou redução de TNF- α , IL-6, IL-1 β e demais citocinas comparado ao controle, nas articulações do joelho dos animais (Figura 12 e Tabela 5). Em contrapartida, houve uma notável redução de IL-6, IL-2 e IFN- γ nas articulações dos joelhos dos camundongos do grupo LPeg-FS 15 mg/kg (Figura 12 e Tabela 5) em comparação ao controle, revelando uma importante rota intervencionista de LPeg-FS na fase tardia da doença, mesmo não impactando na melhora visível do escore clínico. A redução de IL-2 e IFN- γ após administração de LFS, também foi demonstrada por HOFFMANN *et al.* (2005),

no entanto em células de nódulos linfáticos de camundongos, não estimulados com ovalbumina e CFA.

Todos os animais do grupo LPeg-FS 15 mg/kg apresentaram escore 16 no 20º dia do tratamento (Figura 9 e Tabela 4). Esta fase crônica da doença possui forte impacto de IL-6 que é fundamental também na fase aguda da resposta inflamatória no modelo CIA. Portanto, IL-6 está envolvida no estágio inicial e final do processo inflamatório (PARK; PILLINGER, 2007). Esses dados demonstram uma ação de LPeg-FS na fase tardia da CIA.

IL-2 age principalmente na fase aguda da CIA, sendo responsável pela indução da maturação de linfócitos B e maturação de células T, tipos celulares cruciais no modelo CIA (THORNTON *et al.*, 2000). Estudos de Lee *et al.* (2012), demonstraram que IL-2 é fundamental para a progressão da artrite em modelo CIA. Após administrações de anticorpos monoclonais anti-IL-2, a resposta inflamatória foi suprimida.

IFN- γ também possui papel importante na progressão da doença. Animais deficientes de receptores de IFN- γ , apresentaram uma significativa redução da susceptibilidade da artrite em modelo CIA (KAGEYAMA *et al.*, 1998).

O grupo LPeg-FS 15 mg/kg ficou comprometido estatisticamente, pois dois animais apresentaram a doença no dia do *booster* (Figura 10) e após o óbito de um animal no segundo dia após *booster*. Tendo em vista estes percalços, esperava-se elevados níveis de IL-6, o que não ocorreu, ressaltando o efeito de LPeg-FS neste estágio da doença. No entanto o mesmo grupo não apresentou redução dos níveis de TNF- α , citocina percussora de IL-6, havendo uma dissonância entre a redução de IL-6 e aumento de TNF- α no grupo LPeg-FS 15 mg/kg.

A IL-6 desempenha um papel crucial na estimulação, proliferação e diferenciação celular de células T e B. No modelo CIA, estudos de Liang *et al.* (2009), demonstraram que IL-6 é fundamental para o desenvolvimento da doença nesse modelo experimental. Outro estudo demonstrou que a deleção do gene de IL-6 protege os animais da AR induzida por CII (PARK; PILLINGER, 2007).

IL-6, TGF- β , IL-21 e IL-23 são importantes na geração, expansão e manutenção das células Th17 na CIA (SMOLEN; ALETAHA, 2011).

Encontra partida, o grupo LPeg-FS 10 mg/kg apresentou o inverso, ou seja, redução significativa de TNF- α , mas sem redução de IL-6, IL-2 e IFN- γ .

Ambas as concentrações 10 mg/kg e 15mg/kg não afetaram os níveis de IL-1 β . A dose resposta de LPeg-FS 10 mg/kg e 15 mg/kg parece afetar uma via específica, mesmo que estas citocinas possuam uma relação direta, como é o caso de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . No entanto RIOJA *et al.* (2004) apresentaram resultados que corroboram com essa dissonância. Os autores relataram a relação estreita entre a expressão de mRNA de IL-1 β e IL-6, mas não de TNF- α , nas articulações inflamadas de camundongos DBA/10IaHsd CIA. Estes dados demonstram uma rota intervencionista de LPeg-FS ainda desconhecida, que repercute nos níveis de TNF- α , IL-6, IL-2 e IFN- γ de forma distinta em modelo CIA.

O estudo não apresentou, uma relação significativa entre redução de TNF- α , IL-6, IL-2 e IFN- γ nas amostras das articulações dos joelhos dos animais, com os níveis de TGF- β 1 e IL-10, principal rota de ação da interação LFS com macrófagos, previamente descrita (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002; MA; WU; NAKANISHI, 2011). O grupo LPeg-FS 15 mg/kg (Figura 12 e Tabela 5) na qual houve redução significativa de IL-6, IL-2 e IFN- γ , não apresentou níveis significativos de TGF- β 1 (Figura 12 e Tabela 5) em comparação ao controle, não demonstrando claramente uma possível intervenção de TGF- β 1 na redução do processo inflamatório. O mesmo ocorre com a concentração LPeg-FS 10 mg/kg que reduziu significativamente TNF- α , corroborando os estudos de Huynh, Fadok e Henson (2002), mas não apresentou níveis significativos de TGF- β 1. Porém, é necessário ponderar que os estudos anteriores avaliaram a relação TGF- β 1 com o tratamento de LFS, a partir do soro dos animais e não das articulações dos joelhos (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002; MA; WU; NAKANISHI, 2011).

TGF- β 1 é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células, sendo empregada principalmente por células T reguladoras (WAN; FLAVELL, 2008). Sua ação na administração de LFS é fundamental para o efeito anti-inflamatório de acordo com estudos de Huynh, Fadok, Henson (2002). No entanto, a maioria das citocinas e moléculas sinalizadoras, possuem efeitos pleiotrópicos devido a variáveis ainda desconhecidas (HAN *et al.*, 2012).

O aumento dos níveis de TGF- β 1 foram detectados nos derrames de líquido sinovial de portadores da AR (FAVA *et al.*, 1989), na membrana sinovial por imuno-histoquímica (CHU *et al.*, 1991), *western blot* (GODDARD *et al.*, 1992) e *northern blot* (TAKETAZU *et al.*, 1994; SZEKANECZ *et al.*, 1995).

A expressão abundante de TGF- β 1, 2 e 3, bem como o TGF β R1 e 2 na membrana sinovial de ratos foi aumentada após a indução por CIA (MÜSSENER *et al.*, 1997). A injeção direta intra-articular de TGF- β 1 ou TGF- β 2 induziu eritema sinovial, edema e infiltração celular, resultando na inflamação e hiperplasia sinovial (ALLEN *et al.*, 1990). Enquanto que a neutralização de TGF- β por um inibidor, reduziu a artrite aguda e crônica induzida por parede celular de estreptococos (WAHL *et al.*, 1993).

Degitz *et al.* (1998) demonstraram que TGF- β 1, embora fundamental para a homeostasia do organismo, possuía uma resposta ambígua. Sua desregulação em Lúpus pode provocar aumento do processo inflamatório e produção de auto-anticorpos, porém sua alta incidência pode resultar em fibrogenese progressiva e lesões em órgãos. Os mesmos ainda demonstraram que o bloqueio de TGF- β 1 em modelo animal reduziu as lesões fibróticas.

A prevenção de CIA por administração de um inibidor de TGFBR1 (HTS466284), que concomitantemente reduziu a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-AA, TNF- α e proliferação celular, realça ainda mais o papel patogênico do TGF- β 1 na artrite (SAKUMA *et al.*, 2007).

Pohlers *et al.* (2007), por sua vez, observaram que níveis expressivos de TGF- β 1 em fibroblastos sinoviais, promoveram uma produção acentuada de metaloproteinases de matriz (MMP), demonstrando a via patogênica de TGF- β 1 na AR (POHLERS *et al.*, 2009). Em uma recente revisão Han *et al.* (2012) apropriaram-se deste questionamento e avaliaram que TGF- β 1 tem forte relação com o processo inflamatório em doenças de pele.

Estes dados podem remeter a rotas alternativas ainda não exploradas do mecanismo de ação de LFS. Novos experimentos são necessários para avaliar a correlação entre LPeg-FS e TGF- β 1 na CIA, além de outros mediadores que não foram analisados neste estudo.

As citocinas IL-4, IL-17A e IL-10 avaliadas por citometria de fluxo (Tabela 5) não apresentaram concentrações significativas nas articulações dos

joelhos dos animais, sendo necessário novas abordagens para determinar a ação dessas citocinas com o efeito de LPeg-FS no modelo CIA.

No estudo *in vitro*, LPeg-FS 100 μ M não demonstrou reduzir o processo inflamatório deflagrado por LPS/PMA na cultura de macrófagos (RAW 264.7 - ATCC[®] TIB-71[™]) (Figura 13 e Tabela 6). O tratamento não apresentou redução das citocinas analisadas por citometria de fluxo e ELISA.

Estudos de Hoffmann *et al.* (2005), empregaram a mesma concentração de LFS (100 μ M) e não demonstraram redução do processo inflamatório em células dendríticas ativadas com 100 ng/mL de LPS. No entanto, Ma, Wu, Nakanishi (2011), demonstraram que 100 μ M de LFS reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais ativados com 10 ng/mL de LPS na concentração de 100 μ M de LFS. Diferentemente desses estudos, a presente pesquisa observou uma concentração exacerbada de TNF- α e IL-6, após o estímulo com 100 ng/mL de LPS mais 10 ng/mL de PMA. Percebe-se por esses estudos anteriores que a concentração de 100 μ M de LFS é empregada mesmo com diferentes condições experimentais e linhagens celulares distintas (HOFFMANN *et al.*, 2005; MA; WU; NAKANISHI, 2011). No entanto, o delineamento de uma curva de concentração poderá ser adequada para futuras intervenções *in vitro*.

A avaliação da oxidação por meio de CLAE é uma metodologia qualitativa, na qual demonstrou unicamente a presença de produtos oxidados na solução LPeg-FS. Este dado é fundamental para delinear futuras alternativas quanto ao emprego de LPeg-FS. Ainda não há um consenso a respeito do impacto que o processo oxidativo exerce no efeito de LFS na artrite experimental, pela ausência de estudos na literatura, sendo este estudo o primeiro a constatar a presença de dienos conjugados em LFS empregados em CIA. No entanto é conhecido que produtos oxidados de FC e FS tendem a promover uma resposta pró-inflamatória na aterosclerose (LEITINGER, 2003). No entanto dependendo das variáveis como concentração e grau de oxidação, esses fosfolipídios podem apresentar ação anti-inflamatória (GREIG; KENNEDY; SPICKETT, 2012). Estruturalmente, a oxidação de FC pode acarretar na desagregação de FS com o movimento de “*flip-flop*” na estrutura lipossomal, promovendo a perda da funcionalidade de FS e da estabilidade da membrana fosfolipídica (VOLINSKY *et al.*, 2011). No entanto FS oxidado

(FSox) é importante para a captação dos corpos apoptóticos pelos macrófagos (KINNUNEN *et al.*, 2012).

Para futuras pesquisas, métodos quantitativos mais robustos como a Espectrometria de Massa mais CLAE (CLAE-EM), serão necessários para avaliar o grau de oxidação dos lipossomos e correlacionar esse dado quantitativo com o efeito de LFS.

A incidência da doença (Figura 10) e o peso dos animais (Figura 11) não foram afetadas pelo tratamento, demonstrando que o efeito de LPeg-FS nas concentrações de citocinas não exerceram impacto clínico.

A via de administração *s.c. in vivo* também tem forte impacto no efeito de LFS. Esta via foi escolhida pela grande população de macrófagos (célula especializada na captação de LPeg-FS), que habitam a região subcutânea. A via de administração *i.p.* também foi considerada (RAMOS *et al.*, 2007) pelo mesmo fator, além da facilidade da técnica de aplicação. Outra via de administração especulada foi a *intra-articular* (*i.a.*), na qual haveria uma aplicação direta de LPeg-FS na região inflamada. No entanto, esta via não foi recomendada para animais de pequeno porte como os camundongos empregados no estudo, pois além da dificuldade da técnica, causa grande sofrimento aos animais (VAN DEN HOVEN *et al.*, 2011). Porém, considerou-se a ausência de estudos com LFS administrados pela via *s.c.*, sendo o presente estudo o primeiro a realizá-lo.

A necessidade de estudos que avaliem a farmacocinética e o acúmulo de LFS no tecido periarticular, devem ser considerados. A necessidade da presença de LFS na região inflamada ainda não foi avaliada por estudos anteriores. Porém, certamente a via de administração bem como as concentrações empregadas tem impacto importante na ação de LFS.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados dos experimentos realizados empregando LPeg-FS, a resolução da artrite crônica no modelo CIA e do processo inflamatório *in vitro*, não foi observada. No entanto LPeg-FS demonstrou uma importante regulação da produção de TNF- α (LPeg-FS 10 mg/kg) e IL-6, IL-2 e IFN- γ (LPeg-FS 15 mg/kg) na fase tardia da doença, nas articulações dos joelhos dos animais induzidos por CII. A via de ação de LPeg-FS ainda é desconhecida, aparentemente não estaria relacionada com TGF- β 1 e IL-10. A incidência da doença e o peso dos animais não foram afetados pelo tratamento. A presença de oxidação nas soluções de LPeg-Fs não foi consistente em apresentar uma resposta quanto aos resultados *in vivo* e *in vitro*, no entanto remete a necessidade de prospectar a relação oxidação/efeito de LFS em futuras pesquisas. Novos estudos precisam ser realizados para avaliar a intervenção terapêutica de LPeg-FS em modelo experimental CIA e em modelo agudo, empregando outras alternativas quanto a dosagem e vias de administração. Novas rotas promotoras que regulam as moléculas sinoviais também devem ser caracterizadas para corroborar o emprego de LPeg-FS como uma nova ferramenta terapêutica em doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 102, jan. 2013.

ALETAHA, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–81, set. 2010.

ALLEN, J. B. *et al.* Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. **The Journal of experimental medicine**, v. 171, n. 1, p. 231–47, jan. 1990.

ALVING, C. R. *et al.* Liposomes containing lipid A: an effective, safe, generic adjuvant system for synthetic vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 6, p. 733–44, jun. 2012.

ASANO, K. *et al.* Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 4, p. 459–67, ago. 2004.

AUGER, I. *et al.* Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. **Arthritis and rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3424–32, nov. 2005.

BARTELD, G. M. *et al.* Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 14, p. 1460–8, abr. 2011.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, jun. 2007.

BERGLIN, E. *et al.* A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 6, n. 4, p. R303–8, jan. 2004.

BIRNBAUM, H. G. *et al.* Direct and indirect costs of rheumatoid arthritis to an employer. **Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine**, v. 42, n. 6, p. 588–96, jun. 2000.

BOJINCA, V.; JANTA, I. Rheumatic diseases and malignancies. **Mædica**, v. 7, n. 4, p. 364–71, dez. 2012.

BRACKERTZ, D.; MITCHELL, G. F.; MACKAY, I. R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. **Arthritis and rheumatism**, v. 20, n. 3, p. 841–50, abr. 1977.

BRAND, D. D.; LATHAM, K. A.; ROSLONIEC, E. F. Collagen-induced arthritis. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1269–75, jan. 2007.

CAMPBELL, I. K.; HAMILTON, J. A.; WICKS, I. P. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. **European journal of immunology**, v. 30, n. 6, p. 1568–75, jul. 2000.

CANDIOTTI, K. Liposomal bupivacaine: an innovative nonopioid local analgesic for the management of postsurgical pain. **Pharmacotherapy**, v. 32, n. 9 Suppl, p. 19S–26S, set. 2012.

CARR, D. J.; GUARCELLO, V.; BLALOCK, J. E. Phosphatidylserine suppresses antigen-specific IgM production by mice orally administered sheep red blood cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 200, n. 4, p. 548–54, set. 1992.

CASELLI, E. *et al.* Inhibition of DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells treated with phosphatidylserines containing unsaturated acyl chains. **Immunopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 205–213, maio. 1992.

CHANG, J.; GIRGIS, L. Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents--a guide for GPs. **Australian family physician**, v. 36, n. 12, p. 1035–8, dez. 2007.

CHO, H. *et al.* Theranostic Immunoliposomes for Osteoarthritis. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, publicado online em out. 2013, doi: 10.1016/j.nano.2013.09.004

CHU, C. Q. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 in rheumatoid synovial membrane and cartilage/pannus junction. **Clinical and experimental immunology**, v. 86, n. 3, p. 380–6, dez. 1991.

CRUZ, L. J. *et al.* Liposomes containing NY-ESO-1/tetanus toxoid and adjuvant peptides targeted to human dendritic cells via the Fc receptor for cancer vaccines. **Nanomedicine (London, England)**, publicado online em set. 2013, doi:10.2217/nnm.13.66

DAMATTA, R. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS microbiology letters**, v. 266, n. 1, p. 29–33, jan. 2007.

DEGITZ, S. J. *et al.* Role of TGF-beta in RA-induced cleft palate in CD-1 mice. **Teratology**, v. 58, n. 5, p. 197–204, nov. 1998.

DESHPANDE, P. P.; BISWAS, S.; TORCHILIN, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. **Nanomedicine (London, England)**, v. 8, n. 8, p. 1323–42, ago. 2013.

DVORIANCHIKOVA, G. *et al.* Phosphatidylserine-containing liposomes promote maximal survival of retinal neurons after ischemic injury. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 1755–9, nov. 2009.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA ONLINE. **liposome, Art.**. Disponível em: <<http://global.britannica.com/EBchecked/media/92244/Phospholipids-can-be-used-to-form-artificial-structures-called-liposomes>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

FADEEL, B.; XUE, D.; KAGAN, V. Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 396, n. 1, p. 7–10, mai. 2010.

FADOK, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 148, n. 7, p. 2207–16, abr. 1992.

FADOK, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, v. 405, n. 6782, p. 85–90, mai. 2000.

FADOK, V. A. *et al.* Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1071–7, jan. 2001.

FAVA, R. *et al.* Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. **The Journal of experimental medicine**, v. 169, n. 1, p. 291–6, jan. 1989.

FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis in a mouse? **Nature clinical practice. Rheumatology**, v. 5, n. 1, p. 1, jan. 2009.

FREEMAN, G. J. *et al.* TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. **Immunological reviews**, v. 235, n. 1, p. 172–89, mai. 2010.

GABRIEL, S. E.; CROWSON, C. S. Risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 171–6, mar. 2012.

GAITONDE, P. *et al.* Phosphatidylserine reduces immune response against human recombinant Factor VIII in Hemophilia A mice by regulation of dendritic

cell function. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 138, n. 2, p. 135–45, fev. 2011.

GEELLEN, T. *et al.* Internalization of paramagnetic phosphatidylserine-containing liposomes by macrophages. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, p. 37, jan. 2012.

GODDARD, D. H. *et al.* Regulation of synovial cell growth. Coexpression of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor by cultured synovial cells. **Arthritis and rheumatism**, v. 35, n. 11, p. 1296–303, nov. 1992.

GRADONI, L.; BRYCESON, A.; DESJEUX, P. Treatment of Mediterranean visceral *Leishmaniasis*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, n. 2, p. 191–7, jan. 1995.

GRANT, G. J.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Regional anesthesia and pain medicine**, v. 26, n. 1, p. 61–3, fev. 2001.

GREIG, F. H.; KENNEDY, S.; SPICKETT, C. M. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 2, p. 266–80, jan. 2012.

HAMBLIN, M. J.; HORTON, M. R. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: diagnostic dilemma. **Pulmonary medicine**, v. 2011, p. 872120, jan. 2011.

HAN, G. *et al.* The pro-inflammatory role of TGF β 1: a paradox? **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 2, p. 228–35, jan. 2012.

HANAHAHAN, D. J. **A Guide to phospholipid Chemistry**. 1. ed. USA: Oxford University Press, p. 224.1997.

HANAYAMA, R. *et al.* Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5674, p. 1147–50, mai. 2004.

HAREL-ADAR, T. *et al.* Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 5, p. 1827–32, fev. 2011.

HARRIS, E. D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **The New England journal of medicine**, v. 322, n. 18, p. 1277–89, mai. 1990.

HEGEN, M. *et al.* Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 11, p. 1505–15, nov. 2008.

HOFFMANN, P. R. *et al.* Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 3, p. 1393–404, mar. 2005.

HUYNH, M.-L. N.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 1, p. 41–50, jan. 2002.

INGLIS, J. J. *et al.* Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. **Nature protocols**, v. 3, n. 4, p. 612–8, jan. 2008.

INOH, Y. *et al.* Inhibitory effects of a cationic liposome on allergic reaction mediated by mast cell activation. **Biochemical pharmacology**, out. 2013.

KAGEYAMA, Y. *et al.* Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 3, p. 1542–8, ago. 1998.

KINNUNEN, P. K. J. *et al.* Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: From biophysics to clinical correlations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 10, p. 2446 – 2455, out. 2012

KLARESKOG, L. Clinical databases and biobanks for etiologic and therapeutic studies in rheumatoid arthritis. **Nature clinical practice. Rheumatology**, v. 2, n. 10, p. 517, out. 2006.

KLIPPEL, J. H. **Primer on the Rheumatic Diseases**. 13. ed. [S.l.] Springer, 2001.

LANGE, F. *et al.* Methotrexate ameliorates T cell dependent autoimmune arthritis and encephalomyelitis but not antibody induced or fibroblast induced arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 4, p. 599–605, abr. 2005.

LEE, S.-Y. *et al.* Interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody immune complex suppresses collagen-induced arthritis in mice by fortifying interleukin-2/STAT5 signalling pathways. **Immunology**, v. 137, n. 4, p. 305–16, dez. 2012.

LEITINGER, N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. **Current opinion in lipidology**, v. 14, n. 5, p. 421–30, out. 2003.

LEVCHENKO, T. S.; HARTNER, W. C.; TORCHILIN, V. P. Liposomes in diagnosis and treatment of cardiovascular disorders. **Methodist DeBakey cardiovascular journal**, v. 8, n. 1, p. 36–41, jan. 2012.

LIANG, B. *et al.* Evaluation of anti-IL-6 monoclonal antibody therapy using murine type II collagen-induced arthritis. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 6, p. 10, jan. 2009.

LIMA, L. G. *et al.* Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. **Cancer letters**, v. 283, n. 2, p. 168–75, out. 2009.

LIPSKI PE. Rheumatoid arthritis. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 17th ed. New York: McGraw-Hill, v.2 p. 2083–2092. 2008.

LIU, H.; POPE, R. M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. **Current opinion in pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 317–22, jun. 2003.

MA, H. M.; WU, Z.; NAKANISHI, H. Phosphatidylserine-containing liposomes suppress inflammatory bone loss by ameliorating the cytokine imbalance provoked by infiltrated macrophages. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 91, n. 6, p. 921–31, jun. 2011.

MARIAT, C. *et al.* Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1461, p. 1681–5, set. 2005.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 6, p. 429–42, jun. 2007.

MEYERS, J. H. *et al.* The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 8, p. 362–9, ago. 2005.

MILLER, E. A.; ERNST, J. D. Anti-TNF immunotherapy and tuberculosis reactivation: another mechanism revealed. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 5, p. 1079–82, maio. 2009.

MIYANISHI, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. **Nature**, v. 450, n. 7168, p. 435–9, nov. 2007.

MOSCA, M.; CEGLIE, A.; AMBROSONE, L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. **Chemistry and physics of lipids**, v. 164, n. 2, p. 158–65, fev. 2011.

MOSER, C. *et al.* Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. **Expert review of vaccines**, v. 12, n. 7, p. 779–91, jul. 2013.

MOTA, L. M. H. DA *et al.* Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152–174, abr. 2012.

MÜSSENER, A. *et al.* Dynamic expression of transforming growth factor-betas (TGF-beta) and their type I and type II receptors in the synovial tissue of arthritic rats. **Clinical and experimental immunology**, v. 107, n. 1, p. 112–9, jan. 1997.

OLIVEIRA, P. G. *et al.* Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 10, p. 2956–65, out. 2011.

PAIDASSI, H. *et al.* How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. **Critical reviews in immunology**, v. 29, n. 2, p. 111–30, jan. 2009.

PANDEY, S. Various techniques for the evaluation of anti arthritic activity in animal models. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 1, n. 2, p. 164–71, abr. 2010.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Bulletin of the NYU hospital for joint diseases**, v. 65 Suppl 1, p. S4–10, jan. 2007.

POHLERS, D. *et al.* Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 3, p. R59, jan. 2007.

POHLERS, D. *et al.* TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1792, n. 8, p. 746–56, ago. 2009.

RAI, P. *et al.* Stable and potent polyvalent anthrax toxin inhibitors: raft-inspired domain formation in liposomes that contain PEGylated lipids. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 14, n. 26, p. 7748–51, jan. 2008.

RAMANI, K. *et al.* Phosphatidylserine containing liposomes reduce immunogenicity of recombinant human factor VIII (rFVIII) in a murine model of hemophilia A. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 4, p. 1386–98, abr. 2008a.

RAMANI, K. *et al.* Passive transfer of polyethylene glycol to liposomal-recombinant human FVIII enhances its efficacy in a murine model for hemophilia A. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 9, p. 3753–64, set. 2008b.

RAMOS, G. C. *et al.* Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 844–50, jul. 2007.

RENDAS-BAUM, R. *et al.* Evaluating the efficacy of sequential biologic therapies for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to tumor necrosis factor- α inhibitors. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 1, p. R25, jan. 2011.

RINDFLEISCH, J. A.; MULLER, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. **American family physician**, v. 72, n. 6, p. 1037–47, set. 2005.

RIOJA, I. *et al.* Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to

prednisolone treatment. **Clinical and experimental immunology**, v. 137, n. 1, p. 65–73, jul. 2004.

RODRIGUEZ-MANZANET, R. *et al.* T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8706–11, mai. 2010.

ROSADA, R. S. *et al.* Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. **BMC immunology**, v. 9, p. 38, jan. 2008.

SABÍN, J. *et al.* Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces. **The European physical journal. E, Soft matter**, v. 20, n. 4, p. 401–8, ago. 2006.

SAKUMA, M. *et al.* TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. **International immunology**, v. 19, n. 2, p. 117–26, fev. 2007.

SANTIAGO, C. *et al.* Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. **Immunity**, v. 27, n. 6, p. 941–51, dez. 2007.

SAVILL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **British medical bulletin**, v. 53, n. 3, p. 491–508, jan. 1997.

SAVILL, J.; GREGORY, C. Apoptotic PS to phagocyte TIM-4: eat me. **Immunity**, v. 27, n. 6, p. 830–2, dez. 2007.

SCHLEGEL, R. A. *et al.* Mechanisms for recognition and phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 406, p. 21–8, jan. 1996.

SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell death and differentiation**, v. 8, n. 6, p. 551–63, jun. 2001.

SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 2, p. 744–52, nov. 2004.

SENNA, E. R. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–7, mar. 2004.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 233–44, mar. 2006.

SILVA, B. F. B. *et al.* PEGylated cationic liposome-DNA complexation in brine is pathway-dependent. **Biochimica et biophysica acta**, 20 set. 2013.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, fev. 1999.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: the role of acute-phase reactants. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 1, p. 43–52, jan. 2011.

SU, E. W.; LIN, J. Y.; KANE, L. P. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 9–13, out. 2008.

SVENSSON, L. *et al.* B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). **Clinical and experimental immunology**, v. 111, n. 3, p. 521–6, mar. 1998.

SZEKANECZ, Z. *et al.* Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 76, n. 2, p. 187–94, ago. 1995.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 621–32, set. 2010.

TAKETAZU, F. *et al.* Enhanced expression of transforming growth factor-beta 2 and transforming growth factor-beta type II receptor in the synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 70, n. 5, p. 620–30, maio. 1994.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 51, n. 4, p. 526–33, jun. 2007.

TEIGE, A. *et al.* CD1d-dependent NKT cells play a protective role in acute and chronic arthritis models by ameliorating antigen-specific Th1 responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 1, p. 345–56, jul. 2010.

THORNTON, S. *et al.* Heterogeneous effects of IL-2 on collagen-induced arthritis. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 165, n. 3, p. 1557–63, ago. 2000.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 146, n. 3, p. 857–68, set. 1977.

TUGWELL P, SHEA B, BOERS M, BROOKS P, SIMON L, STRAND V, W. G. **EVIDENCE-BASED RHEUMATOLOGY**. London: BMJ Publishing Group, v. 43, p. 582. 2004

UMETSU, D. T. *et al.* TIM gene family and their role in atopic diseases. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 321, p. 201–15, jan. 2008.

VAN DEN BERG, W. B.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN LENT, P. L. E. M. Murine antigen-induced arthritis. **Methods in molecular medicine**, v. 136, p. 243–53, jan. 2007.

VAN DEN HOVEN, J. M. *et al.* Liposomal drug formulations in the treatment of rheumatoid arthritis. **Molecular pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 1002–15, ago. 2011.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 37, p. 13837–42, set. 2006.

VIGANÒ, M. *et al.* Anti-TNF drugs in patients with hepatitis B or C virus infection: safety and clinical management. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 2, p. 193–207, fev. 2012.

VITAL, E. M.; EMERY, P. Abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 2, n. 4, p. 365–75, dez. 2006.

VOLINSKY, R. *et al.* Oxidized phosphatidylcholines facilitate phospholipid flip-flop in liposomes. **Biophysical journal**, v. 101, n. 6, p. 1376–84, set. 2011.

WAHL, S. M. *et al.* Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 1, p. 225–30, jan. 1993.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. **Journal of clinical immunology**, v. 28, n. 6, p. 647–59, nov. 2008.

WANDERLEY, J. L. M. *et al.* Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 807–812, jun. 2005.

WANG, Q.-T. *et al.* Etanercept attenuates collagen-induced arthritis by modulating the association between BAFFR expression and the production of splenic memory B cells. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 68, n. 1, p. 38–45, fev. 2013.

WEISMANN, D.; BINDER, C. J. The innate immune response to products of phospholipid peroxidation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1818, n. 10, p. 2465–75, out. 2012.

WONG, K. *et al.* Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8712–7, mai. 2010.

WU, Y.; TIBREWAL, N.; BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 4, p. 189–97, abr. 2006.

WU, Z. *et al.* Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 6, p. 3191–201, mar. 2010.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: cell death in tissue regulation. **The Journal of pathology**, v. 153, n. 4, p. 313–6, dez. 1987.

YANG, Y. *et al.* Tumor-penetrating peptide functionalization enhances the anti-glioblastoma effect of doxorubicin liposomes. **Nanotechnology**, v. 24, n. 40, p. 405101, set. 2013.

ANEXO I



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 120380

Data da Versão do Projeto: 25/01/2013

Pesquisadores:

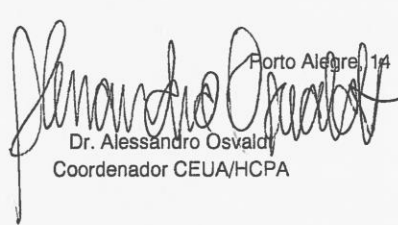
RICARDO MACHADO XAVIER
PATRICIA GNIESLAW DE OLIVEIRA
VIVIAN DE OLIVEIRA NUNES TEIXEIRA
PAULO CÉSAR MARTINS URBANO
VALDERILIO FEIJÓ AZEVEDO
VANETE THOMAZ SOCCOL

Título: EFEITO DE LIPOSSOMOS CONSTITUÍDOS DE FOSFATIDILSERINA NA ARTRITE EXPERIMENTAL

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 14 de fevereiro de 2013.


Dr. Alessandro Osvaldo
Coordenador CEUA/HCPA