UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MOUZARLLEM BARROS DOS REIS

Avaliação da influência da lipoxina A₄ encapsulada em micropartículas de PLGA na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos

Ribeirão Preto – SP

2016

MOUZARLLEM BARROS DOS REIS

Avaliação da influência da lipoxina A₄ encapsulada em micropartículas de PLGA na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Reis, Mouzarllem Barros dos

Avaliação da influência da lipoxina A₄ encapsulada em micropartículas de PLGA na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos. Ribeirão Preto, 2016.

72p. : Il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. LXA₄
2. Cicatrização
3. Micropartículas de PLGA
4. Úlceras
5. Pele

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Mouzarllem Barros dos Reis

Título do trabalho: Avaliação da influência da lipoxina A₄ encapsuladas em micropartículas de PLGA na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^{ra}. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP em conjunto com o Laboratório de Cicatrização e Hanseníase, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus professores, os de ontem, de hoje e os de amanhã.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por ser meu ponto de apoio.

À Prof. Dra. Lúcia Helena Faccioli, por ser um modelo no qual me inspiro dentro e fora da vida profissional. Você ensina através do exemplo. Obrigado.

À Ana Cristine, minha amiga/mãe/irmã, obrigado por ser luz em minha vida. A minha querida amiga Denise, por me ensinar que com calma, podemos levar a vida mais leve.

Ao querido Prof. Dr. Marco Andrey, pelas conversas, conselhos, admiração e por todo o suporte dado ao meu projeto.

À Priscilla Tartari, Guilherme e Marcel, sem vocês nada da minha pesquisa teria se concretizado, contem comigo para o que precisar.

Aos colegas de laboratório, LIME e LIIP, por serem minha família, e me acolherem nas minhas mais diversas necessidades. Eu amo cada um de vocês e só tenho que ser grato o resto da vida por juntos apoiarmos uns aos outros em qualquer circunstância.

Aos colegas de bancada que ajudaram diretamente na execução do projeto (são muitos!), meu muitíssimo obrigado!!!

Para todos os amigos, pessoas queridas que não tenho definição da importância que têm. Só posso ser muito grato e ficar admirado o quanto a vida é generosa em colocar cada um de vocês em meu caminho.

EPÍGRAFE

“O tempo é um tesouro que só encontramos nesta vida.” – Madame Guyon

RESUMO

Reis, Mouzarllem Barros dos. **Avaliação da influência da lipoxina A₄ encapsulada em micropartículas de PLGA na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos**. 60 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Lipoxina A₄ (LXA₄) é um eicosanoide derivado do metabolismo do ácido araquidônico pelas lipoxigenases (5, 12 e 15-LO), tendo propriedades antiinflamatórias e pró-resolução. A estratégia de uso de LXA₄ encapsulada em micropartículas de PLGA como fármaco tem fundamento nas propriedades que tais polímeros têm de preservar as atividades biológicas de moléculas diversas, como dos lipídeos, e promover liberação prolongada e sustentada das mesmas. No presente estudo, tivemos como hipótese de trabalho que a encapsulação de LXA₄ em micropartículas de PLGA (LXA₄-MS) preserva suas atividades biológicas, e mais eficientemente, acelera o fechamento de úlceras induzidas na pele de ratos. Para tanto, um modelo de úlceras cutâneas na região dorsal de ratos foi utilizado. As LXA₄-MS foram fixadas em pele com adesivo biológico de fibrina, e seus efeitos comparados com aqueles induzidos por micropartículas vazias (Un-MS), LXA₄ solúvel ou veículo (PBS). Nossos resultados mostraram que LXA₄-MS aceleram a cicatrização da ferida, pois no 7º dia após a lesão, reduziu em 80% o diâmetro da úlcera inicial, enquanto no mesmo período, nas úlceras tratadas com LXA₄ solúvel, Un-MS ou veículo ocorreu diminuição de somente 60%, 45% e 39%, respectivamente. O aumento do índice de cicatrização induzido pelo tratamento das úlceras com LXA₄-MS foi acompanhado pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , e aumento de TGF- β , uma citocina antiinflamatória indutora da deposição de colágeno. Além disso, nas úlceras tratadas com LXA₄-MS o infiltrado inflamatório foi reduzido no tecido de cicatrização, como demonstrado pela diminuição de infiltrado celular, de MPO e de mRNA da metaloproteinase MMP8. Por outro lado, LXA₄-MS induziu aumento da deposição de colágeno e do número de vasos sanguíneos, de NAG e de IL-4, quando comparado com os demais tratamentos. Quando as úlceras foram tratadas concomitantemente com LXA₄-MS e o antagonista do receptor de LXA₄ (ciclosporina H), observamos reversão de cerca de 50% no índice de cicatrização promovido pelo mediador encapsulado, sugerindo que os efeitos tópicos do tratamento com LXA₄ são devidos à sua interação com seu receptor específico. Nossos resultados sugerem que novas formulações farmacêuticas para tratamento de úlceras cutâneas poderão ser obtidas com LXA₄-MS.

Palavras-chave: LXA₄, PLGA, Cicatrização, Úlceras, Pele, Inflamação, Reparo tecidual

ABSTRACT

Reis, Mouzarllem Barros dos. **Influence of Lipoxin A₄ encapsulated in PLGA microparticles on wound healing in rats**. 60 p. Master's Degree Dissertation – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Lipoxin A₄ (LXA₄) is an eicosanoid derived from the metabolism of arachidonic acid by lipoxygenases (5, 12, and 15-LO), having anti-inflammatory and pro-resolution properties. The strategy of using LXA₄ encapsulated in PLGA microparticles as drug is due to some properties that such polymers have to preserve the biological activity of several molecules such as lipids, and promote a prolonged and sustained release of these molecules. In the present study, we hypothesized that the encapsulation of LXA₄ in PLGA microparticles (LXA₄-MS) preserves its biological activities, and more efficiently accelerates the closing of ulcers induced in the skin of rats. Thus, a model for cutaneous ulcers in the dorsal region of rats was used. The LXA₄-MS were fixed in skin using biological adhesive of fibrin, and their effects compared to those induced by empty microparticles (Un-MS), soluble LXA₄ or vehicle. Our results showed that LXA₄-MS accelerate wound healing, once on day 7 after injury, reduced by 80% the diameter of the initial ulcer, while at the same time, the ulcers treated with soluble LXA₄, Un-MS or vehicle was decreased of only 60%, 45% and 39%, respectively. The increased healing rate of ulcers induced by treatment with LXA₄-MS was accompanied by the decrease of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and a TGF- β increasing, an anti-inflammatory cytokine-inducing collagen deposition. In addition, the inflammatory infiltrate was reduced in scar tissue as demonstrated by the decrease of neutrophils, MPO and MMP8 metalloproteinase mRNA. Moreover, LXA₄-MS induced increase in collagen deposition and the number of blood vessels when compared with the other controls. When the ulcers were treated concomitantly with LXA₄-MS and the antagonist LXA₄ receptor (ALX), cyclosporine H, we observed the reversal of about 50% in healing rates promoted by the encapsulated agent, suggesting that topical treatment effects of LXA₄ are due to interaction with its own receptor. Our results suggest that new pharmaceutical formulations for the treatment of skin ulcers can be obtained with LXA₄-MS.

Keywords: LXA₄, PLGA, Wound Healing, Ulcers, Skin, Inflammation, Tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biossíntese de lipoxina e mediadores lipídicos correlatos a partir do ácido araquidônico.....	28
Figura 2: Ilustração de úlcera cutânea três dias após a injúria tecidual.....	31
Figura 3: Ilustração de úlcera cutânea cinco dias após a injúria tecidual.....	32
Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura das micropartículas.....	47
Figura 5: LXA ₄ -MS acelera o processo de cicatrização.....	49
Figura 6: LXA ₄ -MS diminui o infiltrado inflamatório em úlceras de pele.....	50
Figura 7: LXA ₄ -MS modula a produção de citocinas em úlceras de pele.....	51
Figura 8: LXA ₄ -MS promove mais eficientemente a deposição de colágeno.....	52
Figura 9: LXA ₄ -MS induz neovascularização em úlceras de pele.....	53
Figura 10: Antagonista do receptor de LXA ₄ inibe a melhora na cicatrização promovida por LXA ₄ -MS.....	54
Figura 11: LXA ₄ -MS aumenta o recrutamento de macrófagos e a produção de IL-4.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO	5-lipoxigenase
12-LO	12-lipoxigenase
15-LO	15-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AhR	<i>Arl hydrocarbon receptor</i>
ALX	<i>N-formyl peptide receptor 2</i>
ATL	Aspirin-triggered lipoxins
COX-2	Ciclooxigenase-2
CysLT₁	<i>Cysteinil leukotriene receptor 1</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
H₂O₂	Peróxido de oxigênio
HE	Hematoxilina-eosina
HTAB	Bromete de hexadeciltrimetilamônio
ICC	Índice de cicatrização cutânea
IL-1β	Interleucina 1- β
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
LTA₄	Leucotrieno A ₄
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
LXs	Lipoxinas

LXA₄	Lipoxina A ₄
LXA₄-MS	Micropartículas contendo LXA ₄
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MMP-8	<i>Matrix metalloproteinase-8</i>
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
MS	Micropartículas
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	<i>Poly (latic-co-glycolic acid)</i>
PMN	Polimorfonucleares
PVA	<i>Poly (vinil acetate)</i>
TGF-β	<i>Trasforming growth factor beta</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TMB	Tetrametilbenzedina
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Un-MS	<i>Unloaded microparticles</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho e potencial <i>zeta</i> de micropartículas vazias (Un-MS) ou contendo LXA ₄ (LXA ₄ -MS).....	48
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Lipoxina	27
1.2 Processo de cicatrização.....	30
1.3 Micropartículas e suas aplicações	33
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Preparo de micropartículas contendo LXA₄	38
3.2 Caracterização das micropartículas	38
3.2.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia	38
3.2.2 Eficiência de encapsulação	39
3.2.3 Estudo da taxa liberação <i>in vitro</i>	39
3.3 Animais: Padronização, indução de úlceras e tratamento	40
3.3.1 Animais	40
3.3.2 Indução de úlcera dorsal	40
3.3.3 Grupos e tratamentos das úlceras	41
3.4 Parâmetros analisados.....	42
3.4.1 Índice de Cicatrização Cutânea (ICC) pelo <i>ImageJ</i>	42
3.4.2 Biópsias das úlceras	42
3.4.3 Análise de infiltrado inflamatório e angiogênese por imagem	42
3.4.4 Dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glucosaminidase (NAG).....	43
3.4.5 Quantificação de citocinas e qRT-PCR.....	44
3.4.6 Análise Estatística	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Caracterização das micropartículas de PLGA contendo ou não LXA₄.....	47

4.2 Encapsulamento preserva e potencializa os efeitos biológicos da LXA₄.....	48
4.3 LXA₄-MS modula padrão de citocinas liberadas nas lesões	50
4.4 LXA₄-MS aumenta a deposição de colágeno na pele durante a cicatrização.....	51
4.5 LXA₄-MS aumenta o número de vasos sanguíneos no tecido durante o processo de cicatrização.....	53
4.6 Ciclosporina H, antagonista do receptor de LXA₄, reverte as ações da LXA₄-MS....	54
4.7 LXA₄-MS induz recrutamento de macrófagos e produção de IL-4.....	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO.....	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	72

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lipoxina

As lipoxinas (LXs) são eicosanoides derivados do ácido araquidônico (AA) e se originam pelas vias das lipoxigenases (5, 12 e 15-LO), através da interação entre dois leucócitos ou leucócitos/plaquetas (1). Estes mediadores lipídicos foram descritos em 1984 quando pesquisadores observaram que a adição de 15-H(p)ETE, um metabólito do AA, em leucócitos humanos levou a formação de compostos contendo quatro duplas ligações conjugadas, ou tetraenos. A estrutura do tetraeno mais abundante, que posteriormente viria a ser denominado de LXA₄ (ácido 5,6,15L-hidroxi-7,9,11,13 icosatetraenoico), foi então descrita e caracterizada por métodos cromatográficos (2). Depois, iniciaram-se estudos sobre as atividades biológicas deste composto, o qual foi denominado de lipoxina, por necessitar da metabolização concomitante de várias lipoxigenases (3). Até o momento, são descritas três vias de produção de lipoxinas. Na via da 15-LO, em humanos, há a oxidação inicial do AA pela 15-LO, resultando em 15-H(p)ETE e posteriormente, pela 5-LO, resultando em intermediários e finalmente LXA₄. Esta é uma das principais vias de produção deste eicosanóide, ocorrendo principalmente em tecidos de mucosa, como nos tratos respiratório e intestinal, sendo que este processo se dá por interação entre leucócitos e células epiteliais (4). A segunda via de síntese é a via da 5-LO por PMN, que medeia a metabolização do AA em LTA₄. O LTA₄ pode então sofrer duas metabolizações posteriores: via 15-LO de células epiteliais, ou via 12-LO das plaquetas que se agregam aos PMN, o que resulta na produção de metabólito intermediário que sofre desidratação e culmina na formação de LXA₄ (5). A terceira via de produção resulta na formação de um tipo especial de lipoxina, as *aspirin-triggered lipoxins* ou ATL. A 15-epi LXA₄, como também é conhecida, é formada quando a COX-2 presente no endotélio e no epitélio, na presença de aspirina, consegue ainda metabolizar o AA. A COX-2 que encontra-se acetilada, tem a ela a habilidade de oxigenação de moléculas, comportando-se portanto como uma 15-LO. Assim, o AA então é metabolizado pela COX-2 acetilada e forma 15-H(p)ETE e 15-HETE, e estes são liberados extracelularmente, sendo processados por neutrófilos e metabolizados pela 5-LO, o que culmina na produção das ATL (6). A figura da vias de síntese das LXs encontra-se esquematizada na figura abaixo (Figura 1):

Figura 1: Biossíntese de lipoxina e mediadores lipídicos correlatos a partir do ácido araquidônico.

Fonte: Petasis & Serhan. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2005.

Com o objetivo de caracterizar o receptor da LXA₄, Brezinski e Serhan, em (1991), sintetizaram e caracterizaram LXA₄ marcada com radioisótopo (7). Utilizando a LXA₄ tritiada, sítios de ligação em PMN humanos foram caracterizados pela primeira vez em 1992 (8). Uma série de receptores foram identificados com base na intensidade de ligação com a LXA₄ tritiada e por atividade de GTPase nestes receptores. O receptor *formyl peptide receptor* (FPR), que possui 7 domínios transmembrana e é acoplado a proteína G, teve ligação de alta afinidade com a LXA₄ tritiada, quando comparado com outros eicosanóides, incluindo LXB₄, LTB₄, LTD₄ e PGE₂. Para confirmar a hipótese de que o FPR seria ligante específico da LXA₄, células de ovário de hamster chinês foram transfectadas com cDNA deste receptor (na época denominado de pIN114). O receptor codificado a partir desta transfecção de cDNA mostrou ligação de alta afinidade com a LXA₄, além de estimular a atividade de GTPase e liberação de AA esterificado, evidenciando o FPR como ligante de alta afinidade da LXA₄, capaz de promover a transdução de sinais intracelulares quando ligado à LXA₄ (9).

O receptor FPR (também denominado ALX) é codificado por gene localizado no cromossomo 19q (em humanos), com mRNA de cerca de 2.1 Kb. O cDNA deste receptor possui homologia entre várias espécies sendo de 74% entre humanos e camundongos, e 65% entre humanos e ratos, mostrando-se um receptor evolutivamente bem conservado (10,11). No entanto, este receptor é considerado “promíscuo”, pois liga com menor afinidade outras moléculas, como peptídeos sintéticos, partículas virais e peptídeos derivados de bactérias. Apesar de se ligar ao ALX com alta afinidade, sabe-se que a LXA₄ também é agonista de baixa afinidade de outros receptores, como AhR e receptor de CysLT₁ (3,11–13).

Após o isolamento da molécula em 1984, e ainda no mesmo ano, foi realizado pelo mesmo grupo o primeiro experimento para elucidar as atividades biológicas da LXA₄. Para tanto, a LXA₄ foi adicionada em cultura de neutrófilos humanos, estimulando a produção de ânions superóxidos, mas com discreta ação sobre a degranulação destas células (3). Em células epiteliais, LXA₄ inibe a mobilização das P-selectinas no endotélio e atenua a expressão de CD11/CD18 (14). Também inibe a quimiotaxia, adesão e transmigração de PMN, além de diminuir a produção de IL-1β, expressão de L-selectinas e aumentar a produção de IL-4 (14,15). A LXA₄ também inibe a quimiotaxia de eosinófilos, secreção de IL-5 e eotaxina por estas células (16). Em relação aos efeitos pró-resolução, a principal ação da LXA₄ se dá por estimular a quimotaxia e adesão de monócitos, assim como fagocitose de PMN apoptóticos por macrófagos (14,17).

As primeiras evidências do papel antiinflamatório da LXA₄ *in vivo* foram mostradas em lesão de orelha de ratos, caracterizadas por possuírem grande infiltrado de PMN. Os pesquisadores observaram que o tratamento da lesão com LXA₄ inibiu o infiltrado de neutrófilos e reduziu o tempo de cicatrização (10). Estes resultados abriram um novo entendimento sobre o papel destas células (PMN), até então conhecidas como benéficas por controlarem a infecção de lesões por agentes patogênicos. Assim, por volta do ano 2000, foi sugerido que apesar de garantir proteção, o acúmulo de neutrófilos em úlceras poderia inibir o processo de cicatrização. A comprovação desta hipótese veio com o trabalho de Dovi et al., (2003), que mostraram que a depleção de neutrófilos em camundongos, empregando soro de coelho anti-neutrófilo, acelera a cicatrização da úlcera quando comparado com camundongos não depletados (18). Estes dados, juntamente com o conhecimento de que a superfície do olho tem grande capacidade de reparo, e que a córnea tem grande produção endógena de LXA₄, levou os pesquisadores a utilizarem a aplicação deste mediador para acelerar o processo de cicatrização deste tecido (19). Atualmente, sabe-se ainda que a aplicação de LXA₄ tópica na córnea amplificava a taxa de reepitelização entre 65-90% (20). Esses resultados, em conjunto com outros trabalhos do mesmo período, sugeriram que LXA₄ pode ser relevante para o processo de cicatrização (11,19–24).

1.2 Processo de cicatrização

Cicatrização é um processo dinâmico e interativo que envolve mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular e células do parênquima (Figuras 2 e 3). Este processo constitui-se de três fases: inflamação, formação de tecido (proliferação) e remodelamento tecidual, que se sobrepõe em relação ao tempo de duração (25). Alterações patológicas em uma ou mais fases estão relacionadas com um processo de cicatrização ineficiente ou exacerbado, como fase inflamatória prolongada, fase proliferativa deficiente e remodelamento não coordenado (26). A fase inicial após injúria cutânea tem como componente principal a reação inflamatória mediada por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (27). Nesse microambiente, cascatas de sinalização intracelulares são ativadas, contribuindo para a migração, proliferação e diferenciação de células, além da presença de fluido inflamatório contendo proteinases, mediadores inflamatórios, entre diversas moléculas. Os leucócitos, em especial os neutrófilos e macrófagos, e têm papel fundamental na coordenação da inflamação, assim como nos processos arquitetônicos relacionados à restauração do tecido. A inflamação

local, que dura até o 4º dia, tem grande participação de neutrófilos erradicando patógenos invasores que penetram no sítio da lesão, uma vez que houve quebra da barreira (27). A fase inflamatória, com a participação das células e componentes solúveis envolvidos no processo encontra-se esquematizada na Figura 2:

Figura 2: Ilustração de úlcera cutânea três dias após a injúria tecidual.

Fonte: Singer & Clark. The New England Journal of Medicine, 1999.

Posteriormente à fase inicial da resposta inflamatória, segue a fase de proliferação e remodelamento, para restabelecer a função tecidual, na qual ocorrem diversos eventos importantes: neoangiogênese, formação de tecido e matriz extracelular e início da fase de reepitelização (27). Esta fase geralmente inicia-se no 5º dia, e vai até o final do processo de fechamento da ferida. A angiogênese é um processo de grande importância para cicatrização cutânea, e durante o mesmo ocorre um *switch* na expressão de genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias pelos neutrófilos e macrófagos para modulação do microambiente inflamatório, assim como uma *up* regulação do gene produtor do VEGF, uma proteína que estimula a angiogênese no microambiente de regeneração tecidual. O TGF-β é

um fator clássico de estimulação da colagênese é faz essencial na fase de proliferação, sendo os queratinócitos uma das principais células fonte desta citocina que é quimiotóxica para macrófagos, que irão fagocitar PMN apoptóticos, além de induzir a proliferação de fibroblastos. Estas células são essenciais para a produção de colágeno, elastina, várias classes de glicoproteínas multiadesivas que irão compor a matriz extracelular (28). A fase proliferativa (reepitelização), que ocorre com a participação das células e componentes solúveis encontra-se exemplificada na Figura 3:

Figura 3: Ilustração de úlcera cutânea cinco dias após a injúria tecidual.

Fonte: Singer & Clark. The New England Journal of Medicine, 1999.

O remodelamento tecidual, a última fase do processo, se inicia poucos dias após a injúria e pode durar até dois anos. Este processo é coordenado por proteínas denominadas metaloproteinases de matriz (MMP) (29,30). Em especial, um subgrupo de MMPs tem grande importância na fase de remodelamento, que são aquelas reguladas pelas variações de pH (30,31). Estas, por sua vez, degradam constituintes de um tecido provisório, gerado ainda na fase de reepitelização, como colágeno I, III, IV e VII. Uma vez que haja a remoção do tecido provisório, entra em ação outra classe de proteínas, denominadas TIMPs (*Tissue inhibitor of*

metalloproteinase), que bloqueiam a ação de todas as MMPs, visto que com a remoção do tecido provisório, a ação das MMPs poderia levar a degradação do novo tecido permanente. Assim, há a formação de tecido fibroso definitivo no local ulcerado, que apesar de eficiente, diminui a sensibilidade da área cicatrizada, além de comprometer o funcionamento e proteção do tecido (32,33).

1.3 Micropartículas e suas aplicações

Os sistemas de carreamento de fármacos, em especial aqueles compostos de polímeros orgânicos, têm sido utilizados na terapêutica para entrega de moléculas orgânicas para diversos tratamentos. Esta estratégia facilita a administração de moléculas que têm limitada biodisponibilidade, além de possibilitar o uso de rotas não invasivas. Estes sistemas, ou micropartículas de polímeros injetáveis podem ser preparadas para liberação controlada de proteínas ou lipídios por um período de semanas ou até mesmo meses, dependendo das características do polímero (34–41). A estratégia de encapsulação permite que a atividade biológica da molécula seja preservada, uma vez que protege a molécula de estresses mecânicos, físicos e químicos (oxidação). Além disso, as micropartículas podem carrear as drogas para tecidos específicos, diminuindo a toxicidade em tecidos que não necessitam da ação da molécula em questão, o que é inevitável em vias convencionais de administração sistêmica (42). Os sistemas de liberação de fármacos para aplicação tópica vêm sendo amplamente utilizados por serem capazes de sustentar e restringir a permeação do fármaco somente no tecido cutâneo, com pouca ou nenhuma perda para a corrente sanguínea (43). Para administração pela via tópica, estudos mostram que dependendo do seu tamanho, as partículas poliméricas podem penetrar na pele. Partículas menores que 1 μm , ou seja, nanopartículas, parecem conseguir atravessar o estrato córneo pela via transepidérmica, enquanto partículas na faixa de 3 e 10 μm são capazes de carrear fármacos para dentro da pele pela via transfolicular. No entanto, partículas com diâmetro superior a 10 μm permanecem sobre a pele liberando o fármaco de acordo com suas propriedades farmacocinéticas (44).

O ácido poli-lático co-glicólico (PLGA) tem sido muito utilizado para carrear moléculas em sistemas de liberação. Sua preferência deve-se pela sua alta biocompatibilidade, disponibilidade em diversos pesos moleculares dependendo da combinação dos co-ácidos, fato que influencia no tempo de degradação e demais propriedades do sistema carreador. Além disso, PLGA já tem sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso

em humanos. As partículas de PLGA são definidas como micro ou nano partículas de acordo com as faixas de diâmetros, em micrômetros ou nanômetros (44). Existem hoje na literatura diversos métodos de manipulação de PLGA para a preparação de micropartículas carreadoras. O método por nós utilizado foi o descrito por Nicolette e colaboradores (2009) que se baseia na metodologia de emulsão simples (*oil-in-water emulsion solvent extraction–evaporation process*), que se baseia em uma fase orgânica imiscível em água contendo o polímero e a molécula a ser encapsulada em solução com solvente orgânico (diclorometano); e uma fase aquosa, contendo um tensoativo (PVA) que, por imiscibilidade das soluções em um sistema de rotação das duas fases, forma micropartículas que contém a molécula-alvo da encapsulação (35).

Micro ou nano partículas de PLGA carreando moléculas diversas, em especial proteínas, têm sido muito empregadas para fins diversos (35,45–47). No entanto, são poucos os grupos de pesquisa que utilizam micropartículas de PLGA para *delivery* de lipídeos. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado nos últimos anos a estudar os efeitos biológicos de eicosanoides encapsulados em MS de PLGA. Estas preparações têm sido utilizadas por nosso grupo como uma estratégia para preservar as atividades biológicas destes mediadores, e vários artigos foram publicados com MS contendo LTB₄, PGE₂ ou PGD₂ (35,36,39–41,48–51). No entanto, até o presente, nada existe descrito sobre o uso de PLGA como ferramenta para preservar as atividades biológicas da LXA₄.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi propor uma estratégia biotecnológica para preservar a atividade biológica da LXA₄ e para promover sua liberação de forma sustentada em modelo de cicatrização.

Para alcançar nossos objetivos, LXA₄ foi encapsulada em micropartículas de PLGA (LXA₄-MS) e as mesmas empregadas para o tratamento de úlceras induzidas na pele de ratos. Esses resultados foram comparados com àqueles obtidos em úlceras tratadas com veículo (PBS), micropartículas vazias (Un-MS) e LXA₄ solúvel. Após 2, 7 e 14 dias de tratamento, os seguintes parâmetros foram avaliados:

1. O índice de cicatrização cutânea
2. Presença de infiltrado inflamatório e metaloproteinase 8
3. Produção de citocinas
4. Deposição de colágeno
5. Angiogênese e produção de VEGF
6. Expressão do receptor de LXA₄ (ALX)
7. Efeito do antagonista do receptor da LXA₄ (ciclosporina H) sobre o processo de cicatrização induzido por LXA₄-MS
8. Presença de macrófagos nos tecidos

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo de micropartículas contendo LXA₄

MS contendo LXA₄ ou controle (sem incorporação de mediador lipídico) foram preparadas utilizando o método de simples emulsão óleo-em-água (36,48), seguido do processo de extração-evaporação do solvente. Na fase orgânica interna, 250 µL de LXA₄ (100µg/ml) foram dissolvidos em etanol e adicionados em 10 mL de diclorometano (J.T. Baker/Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA) contendo 100 mg de PLGA 50:50 (Resomer RG 505, MM 78kda –Boehringer Ingelheim-Ingelheim, Alemanha). Logo após, esta fase foi vertida sobre uma fase aquosa externa contendo surfactante (40 mL de solução de polivinil álcool a 3% (PVA)) (Sigma Aldrich Chemicals) e misturada mecanicamente através de um homogeneizador (RW20: IKA) a 600 rpm, por 4h, favorecendo a evaporação do solvente orgânico. Em seguida, as MS foram lavadas três vezes com água deionizada estéril e centrifugadas (25.000 g, 5 min., 25°C). Em seguida foram congeladas a – 80°C, e então, liofilizadas e armazenadas a 4°C. As MS foram avaliadas quanto ao seu tamanho, morfologia, eficiência de encapsulação da LXA₄ e cinética de liberação *in vitro* (52). Para cada lote de MS produzidas foram realizados testes para detecção de endotoxina, empregando o ensaio “Limulus Amebocyte Lysate” (kit comercial LAL, Cambrex Bioscience Inc., Walkersville, MD, EUA) como descrito em Nicolette e colaboradores (2007). Todas as amostras analisadas apresentaram valores de Unidades de Endotoxina (UE) abaixo da faixa de linearidade do método (0,1 a 1 UE/mL).

3.2 Caracterização das micropartículas

3.2.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia

A análise de tamanho foi avaliada através do diâmetro as MS através do analisador de tamanho de partícula (LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer; Beckman Coulter, USA). As MS liofilizadas foram dispersas em água deionizada e submetidas à análise. Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão do tamanho (diâmetro) da partícula.

O potencial zeta foi analisado através do Nano Zeta Sizer (Malvern instruments, Inglaterra). Para esta análise, as MS liofilizadas também foram dispersas em água deionizada. O polímero PLGA (50:50), constituído de ésteres derivados de ácidos láctico e glicólico,

possui residual de carga elétrica negativa. Desta forma, a análise de potencial zeta das MS foi realizada a fim de verificar se a encapsulação alteraria o residual de carga elétrica.

A forma e a superfície das MS liofilizadas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (ZEISS, Evo 50, Cambridge, Inglaterra). As MS foram dispostas sobre porta-amostras (“stubs”) contendo uma fita adesiva isolante. Em seguida, feito o seu recobrimento com outro por 90 segundos e sob corrente elétrica de 40 mA. E posteriormente, à análise microscópica em alto vácuo (1×10^{-5} Torr) e com uma tensão de 5- 20kV.

3.2.2 Eficiência de encapsulação

A taxa de encapsulação da LXA₄ foi feita através da dissolução do polímero (105 mg MS) com 1 mL do solvente orgânico acetonitrila (J.T.Baker. Solusorb®, USA), seguida da agitação em vórtex por 30s, e posterior filtragem e secagem por evaporação do solvente através de um concentrador de amostras (“speed vacuum” Eppendorf, Alemanha). As amostras secas foram resuspensas em 0,5ml do tampão EIA (Cayman). Foram realizadas as quantificações da LXA₄ liberados das MS por ensaio imuno-enzimático de competição, de acordo com instruções do fabricante (EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, N.J., USA). Foram preparadas amostras puras e diluídas 1000 vezes.

3.2.3 Estudo da taxa liberação *in vitro*

Foram utilizadas nos ensaios células de difusão Microette-HANSON RESEARCH CO. (célula de difusão vertical ou célula de Franz, empregada em estudos *in vitro* de permeação cutânea). As amostras avaliadas (LXA₄-MS) foram devidamente pesadas (10 mg), de acordo com a necessidade dos ensaios e a determinação da taxa de encapsulação de cada mediador estudado. A solução receptora utilizada foi PBS 0,15 M/etanol (50:50, v/v), pH 7,4, volume de 7 mL, mantida à temperatura de 37°C, em banho termostaticado com água circulante. Esta fase receptora manteve as condições de “sink” (baseada no coeficiente de solubilidade de cada mediador em meio aquoso). As amostras foram colocadas em contato com uma membrana de acetato de celulose (diâmetro dos poros de 0,45 μ m), sendo que alíquotas de 300 μ L de cada preparação foram aplicadas sobre a membrana. As soluções receptoras foram constantemente agitadas a 300 rpm e alíquotas de 1 mL foram coletadas nos intervalos de tempo pré-estabelecidos: 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 18, 24 e 48 horas. O

equipamento manteve automaticamente o volume das soluções receptoras constante, a fim de se evitar a saturação do meio. Os mediadores lipídicos presentes nas alíquotas coletadas foram quantificados pelo método de ELISA. Para o cálculo da % liberação acumulativa dos mediadores foi utilizada a seguinte fórmula, no intervalo de tempo analisado:

$$\text{Conc.}_{\text{real}} (\%) = (\text{Conc.}_{\text{encontrada}} (\text{método}) \times \text{Vol.}_{\text{meio receptor}}) + (\text{Conc.}_{\text{anterior}} \times \text{Vol.}_{\text{amostra}})$$

3.3 Animais, indução de úlceras e tratamento

3.3.1 Animais

Ao todo foram utilizados 105 ratos *Wistar* machos (180g à 200g) obtidos do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto ou do biotério do Central do *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em condições de isolamento em gaiolas individualizadas, com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, de acordo com o Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob nº 016/2014-1. (Anexo 1)

3.3.2 Indução de úlcera dorsal

Os ratos foram pesados e posteriormente anestesiados com quetamina e xilazina 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. Posteriormente, o dorso dos animais foi tricotomizado e limpo com álcool 70%, onde foram feitas duas excisões cirúrgicas com auxílio de *punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro, atingindo somente a região dermo-epidérmica. Os ratos foram alojados em gaiolas individuais onde permaneceram durante todo o período de estudo (14 dias). Nos dias 2, 7 e 14 após a indução das úlceras, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. Os experimentos foram realizados uma única vez. Os tecidos coletados pelo *punch* no dia 0 foram utilizados como controles dos diversos parâmetros avaliados (tempo zero).

3.3.3 Grupos e tratamentos das úlceras

Os animais foram separados em 6 grupos, cada grupo composto por 15 animais (n=105 animais), como disposto a seguir:

Grupo F1: 15 animais com cada úlcera tratada com veículo (8µL - PBS);

Grupo F2: 15 animais com cada úlcera tratadas com 10 mg de micropartículas vazias (Un-MS) /150 µl de adesivo de fibrina;

Grupo F3: 15 animais com cada úlcera tratada com 8µL de uma solução de LXA₄ solúvel (100 µg/ml) /150 µl de adesivo de fibrina;

Grupo F4: 30 animais com cada úlcera tratada com 10 mg de micropartículas contendo LXA₄ (LXA₄-MS) /150 µl de adesivo de fibrina. Neste grupo, os animais foram divididos em dois subgrupos que foram utilizados separadamente.

Grupo F5: 15 animais com cada úlcera tratada com 8 µl de solução de Ciclosporina H (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) - (1mg/mL);

Grupo F6: 15 animais com cada úlcera tratada previamente com 8 µl de de Ciclosporina H (1mg/ml) + 10 mg de LXA₄-MS/150 µl de adesivo de fibrina;

Nos dias 2, 7 e 14 apos indução das ulceras, 5 ratos/período foram eutanasiados por sobredose anestésica de pentobarbitol sódico (200 mg/kg). Todos os tratamentos, com exceção do veículo (PBS), foram aplicados com a cola de fibrina. Este bioadesivo é composto por uma proporção de 2:1 de fibrinogênio e trombina, respectivamente. As micropartículas foram dissolvidas em 100 µl fibrinogênio, com posterior adição de 50 µl de trombina, o que resulta na formação de uma cola de aspecto gelatinoso e que contém a micropartícula com o mediador lipídico, que é então aplicada sobre a úlcera. A aplicação foi repetida a cada três dias, visto que estudos de Tartari e colaboradores (2013) mostraram que o perfil de liberação desses mediadores lipídicos, quando encapsulados em partículas de PLGA, atinge marca de 50% de liberação do conteúdo de MS em aproximadamente 3 dias.

3.4 Parâmetros analisados

3.4.1 Índice de Cicatrização Cutânea (ICC) pelo *ImageJ*

Cada um dos animais dos seis grupos foram avaliados visualmente quanto à evolução do processo de cicatrização, e as úlceras fotografadas com câmera digital Sony DSC-P100 nos dias 0, 2, 7 e 14 após lesão. Para tanto, a câmera foi fixada em base com régua milimetrada em distância padrão de 30 cm e perpendicular à úlcera, conforme descrito por Frade e colaboradores (2014). A partir das fotografias, o índice de cicatrização (ICC) de cada úlcera foi calculado empregando o software *ImageJ* 1.45, disponibilizado por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institutes of Health – NIH* (Bethesda, Maryland, EUA). O ICC corresponde à expressão matemática definida como o quociente entre as diferenças da área inicial (dia zero) e área final (nos dias 2, 7 ou 14) sobre a área inicial (ROBSON et al., 2000): $(\text{Área}_{\text{inicial}} - \text{Área}_{\text{final}}) / \text{Área}_{\text{inicial}}$.

3.4.2 Biópsia das úlceras

Após a eutanásia dos animais e análise do ICU pelo *ImageJ*, os tecidos ao redor de cada lesão foram coletados. Para tanto, toda a pele foi removida do dorso do animal e por meio do *punch* histológico o tecido ao redor da úlcera foi removido, e foram coletados fragmentos de tecido de 1,5 cm de diâmetro em formato cilíndrico na região da úlcera.

Fragmento 1: acondicionado em solução de formaldeído 4% para o preparo de cortes histológico (hematoxilina-eosina e Picrossirius Red);

Fragmento 2: congelado em freezer -80 °C em tampão para quantificação de citocinas, MPO, análise por qRT-PCR;

3.4.3 Análise de infiltrado inflamatório e angiogênese por imagem

As biópsias obtidas como descrito no item 3.4.2 foram acondicionadas por 24 horas em solução de formaldeído 4% seguindo protocolo já estabelecido no Laboratório de Dermatologia do HCFMRP-USP, coordenando pelo colaborador do projeto, Prof. Dr. Marco Andrey Frade. Os cortes de 5 µm feitos em micrótomo foram corados com hematoxilina-

eosina para avaliação do infiltrado inflamatório, número de fibroblastos e vasos sanguíneos. Cortes corados com Picrossirius Red foram utilizados para a marcação de fibras de colágeno

As lâminas coradas foram visualizadas em microscópio de campo claro com câmera acoplada para captura de imagens. Foram fotografados 5 campos por lâmina com aumento de 400 x. Antes do processo de quantificação que foi realizado empregando o *software ImageJ*, as imagens foram digitalizadas padronizando-se a objetiva, intensidade de luz do microscópio e altura do condensador, segundo Frade e colaboradores (2014).

O programa empregado para contagem de células no infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos foi o *Plug-in* “Cell Counter” do *ImageJ*, disponibilizado por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institutes of Health – NIH* (Bethesda, Maryland, EUA) em cada uma das cinco imagens adquiridas. O *Plug-in* conta as células baseado em cada clique feito pelo analista da amostra. Isto foi aplicado em cada uma das amostras coletadas nos tempos de 0, 2, 7 e 14 dias após a indução das úlceras, sendo o resultado final expresso como o número de células no infiltrado inflamatório. O mesmo processo vale para a contagem de vasos sanguíneos. Os resultados foram comparados com os valores obtidos nos tecidos removidos no dia zero. A quantificação de colágeno foi realizada utilizando o *Plug-in Colour deconvolution*, também do *ImageJ*. As imagens foram decompostas em matrizes de cor, de modo a permanecer na imagem final somente a coloração vermelha corresponde à marcação com Picrossirius Red que marca as fibras de colágeno. A área em vermelho foi então quantificada como porcentagem da área do campo de microscopia.

3.4.4 Dosagem das enzima mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-glucosaminidase (NAG)

A dosagem de MPO foi realizada para avaliar o infiltrado de neutrófilos nas lesões nos diferentes períodos segundo método já descrito por Souza e colaboradores, 2001). Os tecidos das biópsias foram acondicionados em *eppendorf* de 2 ml contendo 200 µl de tampão gelado NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02M, EDTA 0,015 M (tampão 1) em pH 4,7 para permanência no freezer à -80 °C até o dia da quantificação. Os fragmentos foram então homogeneizados em POLYTRON® PT 3100 (IKA, Germany) a 13.000 rpm. Após a centrifugação, os fragmentos macerados foram ressuspensos em uma segunda solução de NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5%

de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (tampão 2). Foram retirados 5 µl do sobrenadante para distribuição em placa de 96 poços, onde foi feita a curva de calibração. Em cada poço da placa foram adicionados 25 µl de TMB (“3, 3’, 5, 5’ – tetrametilbenzedina”) e em seguida 100 µl de H₂O₂. A reação foi então interrompida após a coloração visual da curva com ácido sulfúrico 4 M e lida a 450 nm em leitor de multiplacas SpectraMax Paradigm. Os resultados foram expressos em número de neutrófilos x 10³/mg de tecido, visto que para dosagem, foi utilizado curva de neutrófilos previamente padronizada no laboratório. O sobrenadante final do ensaio de MPO também foi utilizado para quantificação de macrófagos nas feridas, verificada pela atividade da enzima N- Acetilglicosaminidase (NAG) no tecido íntegro (0h) e em cicatrização. Para isto, foram utilizados 25 µl deste sobrenadante que foram colocados em placas de 96 poços. Nesses poços foram adicionados 25 µl de solução 2,24 mM de NAG (p-nitrophenyl-2-acetamide-β-D-glucopiranoside) (Sigma-Aldrich) e 100 µl de tampão citrato (50 mM, pH 4,5). A seguir, foram incubadas a 37° C durante 60 minutos. Por último, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de tampão glicina (200 mM, pH 10.4), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 405 nm (Protocolo descrito por Frade e colaboradores (2014)).

3.4.5 Quantificação de citocinas e qRT-PCR

As úlceras foram homogeneizadas em solução de PBS e centrifugadas. O sobrenadante do homogenato foi armazenado em freezer -80° C e utilizado para quantificar por ensaio imunoenzimático (ELISA), as citocinas IFN-γ, IL-4, IL-6, TNF-α, TGF-β, IL-1β e VEGF (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA). Seguindo as instruções dos fabricantes foram empregados anticorpos específicos e citocinas padrões. As concentrações das citocinas foram avaliadas em espectrofotômetro de microplaca com filtro a 450 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão. A extração de RNA dos tecidos de úlceras homogeneizadas previamente (20 mg de tecido) ocorreu por kit comercial RNeasy Mini (RNeasy® Mini, Qiagen Inc., CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. O DNA complementar (*cDNA*) foi sintetizado a partir de 700 ng de RNA utilizando-se *primers* randômicos. Aliquotas de 2µL da quantidade total de cDNA foram amplificadas por qRT-PCR utilizando primers para *Fpr2l* e *Mmp8* em um Eppendorf Mastercycler® ep Realpex (Eppendorf AG; Hamburg, Germany). O gene *Gapdh* foi utilizado como gene de referência.

3.4.6 Análise Estatística

Para análises de resultados, as variações estatísticas entre grupos foi determinada utilizando análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste t de Student quando apropriado. Valores menores que $p < 0.05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das micropartículas de PLGA contendo ou não LXA₄

Micropartículas contendo LXA₄ (LXA₄-MS) e micropartículas vazias (Un-MS), após liofilizadas, foram dispersas em água deionizada para avaliação do seu tamanho e carga residual. O diâmetro médio foi de 5,4 μm ($\pm$ 5,6 μm) e 3,9 μm ($\pm$ 4,4 μm) para LXA₄-MS e Un-MS, respectivamente (Tabela 1). A análise de carga residual das micropartículas mostra se após o encapsulamento, houve interação química e consequentemente elétrica entre o polímero e a molécula-alvo (LXA₄). O potencial zeta foi de -1,13 mV ($\pm$ 9,6 mV) e -4,56 mV ($\pm$ 4,8 mV) para LXA₄-MS e Un-MS, respectivamente (Tabela 1). Para avaliar se as micropartículas estavam contaminadas com LPS, o teste de LAL foi feito para avaliação da quantidade de endotoxina, que não detectou LPS nas amostras. A microscopia eletrônica de varredura das micropartículas é mostrada na Figura 4, na qual Un-MS e LXA₄-MS mostraram superfície esférica e uniforme. A eficiência de encapsulação, experimento que mostra o quanto de LXA₄ foi encapsulada/10 mg de polímero foi feito usando kit EIA (ELISA). A quantidade de LXA₄ foi de aproximadamente 800 ng, o que representa uma eficiência de encapsulação de 32 %.

Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura das micropartículas. (a) Micropartículas vazias e (b) LXA₄-MS. 15.0 kV. 2000x.

Tabela 1. Tamanho e potencial *zeta* de micropartículas vazias (Un-MS) ou contendo LXA₄ (LXA₄-MS).

	Un-MS	LXA ₄ -MS
Tamanho	3,9 μm ($\pm$ 4,4 μm)	5,4 μm ($\pm$ 5,6 μm)
Potencial Zeta	-4,56 mV ($\pm$ 4,8 mV)	-1,13 mV ($\pm$ 9,6 mV)

O tamanho das partículas e potencial zeta foram determinados em um único lote de micropartículas em triplicata. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão.

4.2 Encapsulamento preserva e potencializa os efeitos biológicos da LXA₄

LXA₄ solúvel aumentou o índice de cicatrização da úlcera quando comparada ao tratamento com Un-MS ou veículo, entretanto, LXA₄-MS foi ainda mais eficiente em fechar a lesão (Figura 5). No 2º dia após a indução da úlcera, os três tratamentos – Un-MS, LXA₄ solúvel e LXA₄-MS – não modificaram o tamanho das úlceras, quando comparados ao veículo. Entretanto, no sétimo dia pós-úlcera, LXA₄ solúvel aumentou o índice em 60% da úlcera (relativo à área inicial), e LXA₄-MS em torno de 80%. No 14º dia, o índice de cicatrização das úlceras tratadas com LXA₄-MS foi próximo de 100%, sendo significativa a diferença em relação aos demais grupos. Estes resultados mostram que, apesar da LXA₄ solúvel ser efetiva, o encapsulamento do mediador potencializou seus efeitos, indicando que o processo de encapsulação preserva a atividade biológica da molécula, além de promover sua liberação sustentada.

Em seguida, avaliamos o número de células no infiltrado inflamatório nas úlceras. Para tanto, cortes histológicos corados com HE foram analisados pelo *software* ImageJ. Observamos que o número de células inflamatórias nas feridas tratadas com LXA₄-MS estava significativamente reduzido em comparação com outros grupos (Figura 6a). A quantificação de MPO (Figura 6b) corroborou os dados da análise histológica, pois mostrou que no 2º e 7º dia de tratamento com LXA₄-MS, o número de neutrófilos estava estatisticamente menor em relação aos outros tratamentos. MMP8, uma metaloproteinase produzida por neutrófilos, também estava diminuída nas lesões tratadas com LXA₄ solúvel ou LXA₄-MS, no 14º dia (Figura 6c). Esses resultados mostram que LXA₄-MS tem ação antiinflamatória, pois reduziu fase inflamatória do processo de cicatrização (1º à 5º dia após indução da úlcera).

Figura 5. LXA₄-MS acelera o processo de cicatrização. (a) Fotografia da úlcera (150 mm) no dorso de ratos *Wistar* mostrando as alterações macroscópicas induzidas pelo tratamento com: veículo (PBS), Un-MS, LXA₄ solúvel ou LXA₄-MS nos dias 0, 2, 7 e 14. (b) Índice de cicatrização cutânea induzido pelos diferentes tratamentos. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 úlceras), * LXA₄ solúvel ou LXA₄-MS vs veículo, $p < 0.05$; # LXA₄ solúvel ou LXA₄-MS vs Un-MS, $p < 0.05$; \$ LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, $p < 0.05$, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA.

Figura 6: LXA₄-MS diminui o infiltrado inflamatório em úlceras de pele. A injúria induziu aumento de infiltrado celular e MPO, como expresso nas barras sobescritas com *, que demonstram aumento significativo em relação ao tecido normal (linha tracejada). Os animais foram tratados topicamente com veículo (PBS), Un-MS, LXA₄ solúvel e LXA₄-MS. **(a)** Contagem de células inflamatórias no tecido da úlcera no dia 2 utilizando o software ImageJ. Foram utilizados pelo menos 12 campos randômicos por grupo. **(b)** Acumulo de neutrófilos nas úlceras quantificadas através de ensaio para detecção de MPO. Valores representam médias $\pm$ EPM, [#]LXA₄-MS vs veículo, $p < 0.05$; ^{\$}LXA₄-MS vs Un-MS, $p < 0.05$; [&]LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, $p < 0.05$, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA. **(c)** qRT-PCR para o gene da metaloproteinase 8 *Mmp8* em biopsia de pele do 14º dia após a indução da úlcera. Valores representam médias $\pm$ EPM, ^{*}LXA₄-MS vs veículo, $p < 0.05$; [#]LXA₄-MS ou LXA₄ solúvel vs Un-MS, $p < 0.05$; ^{\$} LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, $p < 0.05$, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA.

4.3 LXA₄-MS modula padrão de citocinas liberadas nas lesões

Para investigar se a diminuição do infiltrado inflamatório induzido por LXA₄-MS estaria relacionado com a modulação da produção de citocinas, a quantificação de IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-6 foi realizada. Nossos dados mostram que IL-1 β e TNF- α (Figura 7a e 7b), foram significativamente inibidas pelo tratamento com LXA₄-MS, tanto no 2º como no 7º dia. No entanto, IL-6 (Figura 7d) só foi diminuída no 7º dia após tratamento. Quanto ao TGF- β , observamos aumento no 2º dia de tratamento com LXA₄-MS, mas diminuiu no 7º (Figura 7c). Todas as citocinas tendem a atingir valores semelhantes no 14º dia, devido ao fechamento quase que total das úlceras.

Figura 7: LXA₄-MS modula a produção de citocinas em úlceras de pele. A injúria induziu aumento de citocinas, como expresso nas barras sobescritas com *, que demonstram aumento significativo em relação ao tecido normal (linha tracejada). Os animais foram tratados topicamente com veículo (PBS), Un-MS, LXA₄ solúvel e LXA₄-MS. Os tecidos provenientes das biópsias realizadas nos animais nos dias 2, 7 e 14 foram homogeneizados e o sobrenadante utilizado para dosagem das citocinas. **(a)** IL-1 β , **(b)** TNF- α , **(c)** TGF- β e **(d)** IL-6 foram quantificadas por ELISA. Valores representam médias $\pm$ EPM, #LXA₄-MS ou LXA₄ solúvel ou Un-MS vs veículo, $p < 0.05$; \$LXA₄-MS ou LXA₄ solúvel vs Un-MS, $p < 0.05$; &LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, $p < 0.05$, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA.

4.4 LXA₄-MS aumenta a deposição de colágeno na pele durante o processo de cicatrização

A deposição de colágeno é um evento importante para o processo de cicatrização. As análises de cortes histológicos corados com Picrosírius mostram que úlceras tratadas com LXA₄-MS tiveram aumento na deposição de colágeno. Resultado semelhante foi observado nas úlceras tratadas com LXA₄-MS solúvel (Figura 8). LXA₄-MS também aumentou a deposição de colágeno nos dias 7 e 14, fato não observado com o mediador solúvel (Figura 8).

Figura 8: LXA₄-MS promove mais eficientemente a deposição de colágeno. (a) Microscopia de úlceras marcadas com Picrosirius Red (200x), mostrando a deposição de colágeno nos dias 2, 7 e 14. (b) Quantificação de colágeno utilizando o *Software ImageJ*, *plug-in Colour Deconvolution*, que mediu a densitometria digital em pelo menos 12 campos ópticos randômicos em microscopia de 200x. Resultados são expressos em porcentagem da área coberta com colágeno. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 úlceras), *LXA₄ solúvel ou LXA₄-MS vs veículo, $p < 0.05$; [#]LXA₄ solúvel ou LXA₄-MS vs Un-MS, $p < 0.05$; ^{\$}LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, $p < 0.05$, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA.

4.5 LXA₄-MS aumenta o número de vasos sanguíneos no tecido durante o processo de cicatrização

O número de vasos sanguíneos foi avaliado pela análise histológica dos cortes de biópsias corados com HE e confirmado por meio da quantificação de VEGF (*vascular endothelial growth factor*). LXA₄-MS estimulou neovascularização acentuada como observado nos tecidos dos dias 2, 7 e 14 (Figura 9a). Em relação à concentração de VEGF nos mesmos grupos e dias, observamos que o VEGF não foi diferente nos dias 2 e 7 após indução da úlcera, mas sendo significativa a diferença somente no 14º dia (Figura 9b).

Figura 9: LXA₄-MS induz neovascularização em úlceras de pele. Os animais foram tratados topicamente com veículo (PBS), Un-MS, LXA₄ solúvel e LXA₄-MS. Foram analisadas lâminas histológicas das úlceras marcadas com HE para a contagem de vasos. Os campos foram fotografados em aumento de 400x. O *software* ImageJ foi utilizado para contagem de vasos nos dias 2, 7 e 14 após injúria e foram analisados pelos menos 10 campos randômicos por grupo. **(a)** Análise da densidade vascular. **(b)** Quantificação de VEGF no sobrenadante de homogenatos de úlceras por ELISA. Valores representam médias $\pm$ EPM, [#]LXA₄-MS vs veículo, $p < 0.05$; ^{\$}LXA₄-MS vs Un-MS, $p < 0.05$; [&]LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, $p < 0.05$, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA.

4.6 Ciclosporina H, antagonista do receptor de LXA₄, reverte as ações da LXA₄-MS

Para avaliar se os efeitos biológicos observados pelo tratamento com LXA₄-MS seriam devido à ligação específica de LXA₄ ao seu receptor de alta afinidade, úlceras foram tratadas utilizando-se três estratégias: tratamento com ciclosporina H, um antagonista do receptor de LXA₄; tratamento com ciclosporina H + LXA₄-MS; tratamento com LXA₄-MS. A Figura 10a mostra que somente o tratamento com antagonista não teve efeito sobre o fechamento da úlcera, assim como o uso de LXA₄-MS + antagonista. Entretanto, em úlceras tratadas somente com LXA₄-MS, o melhoramento na cicatrização foi restaurado (Figura 7b). A análise da expressão do receptor de LXA₄ por qRT-PCR mostrou que o mRNA encontra-se regulado positivamente em úlceras tratadas com LXA₄-MS (Figura 10c), sugerindo que as ações da LXA₄ sobre o processo de cicatrização são via receptor específico, que então modula os efeitos anti-inflamatórios e proliferativos observados.

Figura 10: Antagonista do receptor de LXA₄ inibe a melhora na cicatrização promovida por LXA₄-MS. Nos tratamentos concomitantes com ciclosporina H e LXA₄-MS, o antagonista foi aplicado sobre na úlcera 10 minutos antes da aplicação de LXA₄-MS. **(a)** Índice de cicatrização cutânea induzido pelos tratamentos com: ciclosporina H, LXA₄-MS ou LXA₄-MS + ciclosporina H. **(b)** Fotografia da úlcera (150 mm) no dorso dos ratos mostrando as alterações macroscópicas induzidas pelo tratamento com: ciclosporina H, LXA₄-MS ou LXA₄-MS + ciclosporina H nos dias 0, 2, 7. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 úlceras), [#]Ciclosporina H + LXA₄ vs LXA₄-MS, p<0.05, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA. **(c)** Quantificação do mRNA do receptor de LXA₄ (ALX) feito por qRT-PCR nos grupos: veículo, Un-MS, LXA₄ solúvel e LXA₄-MS. Valores representam médias $\pm$ EPM, * LXA₄-MS vs veículo, p< 0.05; [#]LXA₄-MS vs Un-MS, p<0.05; ^{\$}LXA₄-MS vs LXA₄ solúvel, p<0.05, comparados pela análise de variância One-Way ANOVA.

4.7 LXA₄-MS induz recrutamento de macrófagos e produção de IL-4

Para avaliar o aumento de macrófagos nas lesões, determinamos nas mesmas a concentração de NAG, uma enzima presente somente nestas células mononucleares. Como mostra a figura 11a, quando compara com úlceras tratadas somente com o veículo (PBS), as lesões tratadas com LXA₄-MS apresentam aumento significativo na concentração de NAG. Este dado indica que nestas úlceras, houve maior recrutamento de macrófagos no 14º após a lesão e tratamento. Sabendo que IL-4 é uma citocina antiinflamatória, e que pode ser originada de macrófagos M₂ e ou de linfócitos T, nosso próximo passo foi avaliar a concentração desta citocina nas lesões tratadas com LXA₄-MS ou somente veículo. Como mostra a figura 11b, no 14º dia o tratamento com LXA₄-MS induziu aumento de aproximadamente 120% na concentração de IL-4, quando comparado com úlceras tratadas somente com veículo. Interessante que nos dias 2 e 7, que correspondem à fase inflamatória e de proliferação da cicatrização, a LXA₄-MS reduziu significativamente a produção de IL-4.

Figura 11. LXA₄-MS aumenta o recrutamento de macrófagos e a produção de IL-4. (a) Quantificação de NAG em úlceras tratados com veículo e LXA₄-MS durante 14 dias, expresso em densidade óptica. (b) Quantificação por ELISA da citocina IL-4 em tecido de úlcera tratado com veículo e LXA₄-MS. Dados representam médias $\pm$ EPM (n=5 úlceras por grupo) no 14º dia após a indução da úlcera, * Veículo ou LXA₄-MS vs Basal, $p < 0.05$, #LXA₄-MS vs veículo, $p < 0.05$, comparados pelo teste t de Student.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Queimaduras, diabetes, isquemia e mesmo envelhecimento são condições que favorecem a formação de úlceras (53–55), que se não tratadas, podem causar intenso desconforto, e servirem de porta de entrada para microrganismos resultando em complicações severas e até mesmo a morte (56). Por isto, a busca de novas terapias para o tratamento de feridas tem sido motivo de intensa investigação pelos pesquisadores e pelas indústrias farmacêuticas. Neste trabalho tivemos como objetivo desenvolver micropartículas de PLGA contendo LXA₄ (LXA₄-MS) para o tratamento de úlceras cutâneas. A escolha da LXA₄ como alvo de estudo deve-se ao fato de existirem na literatura, várias evidências experimentais que este mediador tem ação antiinflamatória, além de acelerar a resolução de lesões diversas como úlceras de córnea (19,20,23,24,33). No entanto, nada tinha sido descrito sobre seus efeitos na cicatrização de úlceras cutâneas.

A estratégia de empregar PLGA para encapsular LXA₄ foi baseada na nossa experiência previa que mostra que este polímero preserva as atividades biológicas de lipídeos facilmente oxidáveis, como o LTB₄ (48), PGE₂ (52) e PGD₂ (57). Estes mediadores, assim como a LXA₄ são eicosanoides derivados do metabolismo do AA, e que por possuírem duplas ligações, são altamente reativos e facilmente oxidados, o que resulta em diminuição ou perda de suas atividades biológicas (58). Por isto, estas características dificultam o uso destes composto lipídicos em formulações farmacêuticas. Além de preservarem as atividades biológicas de lipídeos, micropartículas de PLGA promovem a liberação sustentada e prolongada do composto encapsulado (35,50,52). Como mostrado em nossos resultados (Figura 4), o método de emulsão simples por nós empregado, resultou em micropartículas homogêneas, de tamanho adequado, superfície lisa, carga negativa, e com taxa de encapsulação do mediador relativamente alta, todas elas características apropriadas para interação com células de mamíferos e o uso *in vivo* (34–36,39–41,45,48–50,52,59)

O modelo de estudo empregado por nós foi o de indução de úlceras na pele do dorso de ratos utilizando *punch* mecânico, pois se tratam de lesões estéreis e muito bem caracterizadas quanto suas fases de cicatrização (60). Os grupos de estudos foram constituídos por úlceras tratadas a cada 3 dias com LXA₄-MS, Un-MS, LXA₄ solúvel, ou somente veículo (PBS), aplicadas sob cola de fibrina para facilitar a retenção das substâncias. As úlceras foram avaliadas nos dias 0, 2, 7 e 14 dias pós lesão, que correspondem a fase inflamatória, de proliferação e de remodelamento, respectivamente.

As análises macroscópica, microscópicas e moleculares das úlceras mostraram que o tratamento com LXA₄-MS foi mais efetivo do que LXA₄ solúvel, em todos os parâmetros avaliados, tendo efeito expressivo desde o início no processo de cicatrização. LXA₄-MS aumentou significativamente o índice de cicatrização cutânea (que reflete o fechamento da ulcera em relação ao dia inicial) a partir do 7º dia (Figura 5a e 5b). O processo de cicatrização é um fenômeno complexo e coordenado por diferentes tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e outras células (61), que contribuem nas diferentes fases da cicatrização. Sabe-se que os neutrófilos recrutados nas primeiras horas, e os macrófagos, mais proeminentes na fase tardia da cicatrização, são células fundamentais para o reparo.

Os neutrófilos e macrófagos removem restos celulares, eventuais microrganismos presentes, e células mortas, sendo fundamentais para restaurar a lesão (62,63). No entanto, quando presente em número exagerado e por tempo prolongado, estas células podem retardar a cicatrização, e mesmo causar alterações não desejadas nos tecidos (63), eventos que se refletem na diminuição do índice de cicatrização. Nossos dados, mostraram que a aplicação tópica de LXA₄-MS diminuiu o número de neutrófilos infiltrados na lesão (Figura 6a), como evidenciado pela diminuição de MPO e de metaloproteinase 8 (Figura 6b e 6c).

Citocinas pro-inflamatórias como IL1- α , IL1- β , IL6, e TNF- α , e as antiinflamatórias/regulatórias, têm importante papel no reparo tecidual (61). Estas citocinas recrutam células inflamatórias (55,62), estimulam queratinócitos e fibroblastos a proliferarem (24,33,64), induzem síntese e quebra de proteínas da matriz extracelular (61). Sabendo que LXA₄ pode induzir ou inibir a produção de diferentes citocinas, que participam dos eventos acima, investigamos o impacto do tratamento das úlceras com LXA₄-MS na produção destas citocinas. Nossos dados mostraram que LXA₄-MS, de modo mais eficiente que LXA₄ solúvel, inibiu significativamente nos dias 2 e 7 após lesão a produção de IL-1 β e de TNF- α (Figura 7a e 7b), duas citocinas quimiotáticas para neutrófilos (61–63). Embora outros fatores possam estar envolvidos, estes resultados justificam a diminuição de neutrófilos nas lesões tratadas topicamente com LXA₄-MS. Interessante que LXA₄ encapsulada, também aumentou a concentração de TGF- β , sem modificar a de IL-6 (Figura 7c e 7d). Estas citocinas são conhecidas por terem papel crucial no reparo tecidual, em especial TGF- β , que é descrito classicamente por ativar fibroblastos a aumentarem a síntese de colágeno (61). Em conjunto, nossos dados mostram que o papel benéfico da LXA₄ liberada das micropartículas, deve-se a

inibição ou a potenciação da produção destas citocinas, com papéis diversos nos diferentes estágios do processo de cicatrização, resultando no aceleração do índice de fechamento da ulcera.

Como observamos aumento da produção de TGF- β e do índice de cicatrização (Figura 5 e Figura 7) pelo tratamento com LXA₄-MS, nosso próximo passo foi investigar se haveria também maior deposição de colágeno e aumento do número de vasos, eventos fundamentais para o reparo tecidual (25). Colágeno é o componente mais abundante tecido conectivo, e essencial para o reparo de lesões (65), que também depende da formação de novos vasos para fornecimento de nutrientes para o local (66). Como mostrado na Figura 8, LXA₄-MS, mais eficientemente que a LXA₄ solúvel, aumentou a deposição de colágeno, assim como o número e a densidade de vasos no local da lesão (Figura 9), em todos os períodos estudados.

Finalmente, investigamos se efeitos biológicos da LXA₄ liberada das micropartícula, ocorreu via ligação ao seu receptor específico (o ALX). Nossos resultados mostraram que o tratamento simultâneo das úlceras com LXA₄-MS e ciclosporina H, um antagonista do receptor ALX, reduziu de modo significativo os efeitos cicatrizantes benéficos do mediador lipídico (Figura 10). Estes resultados indicam que a LXA₄, pelo menos parcialmente, age via seu receptor específico, o ALX, como ocorre em outros modelos experimentais (11). Em conjunto, nossos dados confirmam outros da literatura que mostram que LXA₄ é um mediador lipídico com ação antiinflamatória e reparadora (1,12,13,15,67), e que LXA₄-MS é uma estratégia eficiente para tratamento de úlceras cutâneas, pois preserva as atividades biológicas do composto, além de permitir uma ação prolongada e benéfica.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O encapsulamento de LXA₄ em micropartículas de PLGA preservou e potencializou suas atividades biológicas e promoveu um processo de cicatrização eficiente e acelerado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McMahon B, Mitchell S, Brady HR, Godson C. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2001 Aug;22(8):391–5.
2. Serhan C, Hamberg M, Samuelsson B. Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;118(3):943–9.
3. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(17):5335–9.
4. Petasis N a., Akritopoulou-Zanze I, Fokin V V., Bernasconi G, Keledjian R, Yang R, et al. Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2005;73(3-4):301–21.
5. Serhan CN, Sheppard KA. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions: Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest*. 1990;85(3):772–80.
6. Clària J, Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9475–9.
7. Brezinski DA, Serhan CN. Characterization of lipoxins by combined gas chromatography and electron-capture negative ion chemical ionization mass spectrometry: formation of lipoxin A4 by stimulated human whole blood. *Biol Mass Spectrom* [Internet]. 1991 Feb [cited 2016 May 5];20(2):45–52.
8. Fiore S, Ryeom SW, Weller PF, Serhan CN. Lipoxin recognition sites. Specific binding of labeled lipoxin A4 with human neutrophils. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Aug 15 [cited 2016 Mar 19];267(23):16168–76.
9. Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J Exp Med* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited

-
- 2016 May 5];180(1):253–60.
10. Takano T, Clish CB, Gronert K, Petasis N, Serhan CN. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest*. 1998;101(4):819–26.
 11. Chiang N, Serhan CN, Dahlén S-E, Drazen JM, Hay DWP, Rovati GE, et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):463–87.
 12. Chandrasekharan JA, Sharma-Walia N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *J Inflamm Res [Internet]*. 2015 Jan [cited 2015 Oct 22];8:181–92.
 13. Bürli RW, Xu H, Zou X, Muller K, Golden J, Frohn M, et al. Potent hFPRL1 (ALXR) agonists as potential anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem Lett [Internet]*. 2006;16(14):3713–8.
 14. Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins [Internet]*. 1997 Feb [cited 2016 Mar 19];53(2):107–37.
 15. Hachicha M, Pouliot M, Petasis NA, Serhan CN. Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med [Internet]*. 1999 Jun 21 [cited 2015 Sep 24];189(12):1923–30.
 16. Bandeira-Melo C, Bozza PT, Diaz BL, Cordeiro RS, Jose PJ, Martins MA, et al. Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. *J Immunol [Internet]*. 2000 Mar 1 [cited 2016 Mar 19];164(5):2267–71.
 17. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol [Internet]*. 2000 Feb 15 [cited 2015 Sep 22];164(4):1663–7.
 18. Dovi J V, He L, Dipietro L a. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice Abstract: The infiltration of neutrophils into injured tissue is known to protect

-
- wounds from in- repair process . To investigate the role of neutro-. J Leukoc Biol. 2003;73:448–55.
19. Gronert K. Lipoxins in the eye and their role in wound healing. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2005;73(3-4):221–9.
 20. Gronert K, Maheshwari N, Khan N, Hassan IR, Dunn M, Schwartzman ML. A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. J Biol Chem. 2005;280(15):15267–78.
 21. Romano M. Lipoxin analogs and lipoxin formation in vivo. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2005;73(3-4):239–43.
 22. Souto LRM, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MHS, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. Sao Paulo Med J. 2006;124(2):71–6.
 23. Biteman B, Hassan IR, Walker E, Leedom AJ, Dunn M, Seta F, et al. Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. FASEB J. 2007;21(9):2257–66.
 24. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature. 2008;453(7193):314–21.
 25. Singer A, Clark R. Cutaneous Wound Healing. 1999;341(10):738–46.
 26. Wilgus T a., Vodovotz Y, Vittadini E, Clubbs E a., Oberyzyyn TM. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. Wound Repair Regen. 2003;11(1):25–34.
 27. Schreml S, Szeimies R-M, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. J Am Acad Dermatol [Internet]. 2010 Nov [cited 2015 Dec 8];63(5):866–81.
 28. Wankell M, Kaesler S, Zhang YQ, Florence C, Werner S, Duan R. The activin binding proteins follistatin and follistatin-related protein are differentially regulated in vitro and during cutaneous wound repair. J Endocrinol [Internet]. 2001 Dec [cited 2015 Dec 30];171(3):385–95.

-
29. Rippke F, Schreiner V, Schwanitz H-J. The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 Jan 30];3(4):261–72.
 30. Dissemond J, Witthoff M, Brauns TC, Haberer D, Goos M. [pH values in chronic wounds. Evaluation during modern wound therapy]. *Der Hautarzt ; Zeitschrift für Dermatologie, Venerol und verwandte Gebiete* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Jan 30];54(10):959–65.
 31. Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, Luoto H, Hanemaaijer R, Salo T, et al. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2002 Jul [cited 2016 Jan 30];31(6):329–38.
 32. Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* [Internet]. 2008 May [cited 2016 Jan 30];158(5):951–61.
 33. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* [Internet]. 2008 Apr [cited 2015 Dec 8];25(4):419–26.
 34. Taluja A, Youn YS, Bae YH. Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins. *J Mater Chem*. 2007;17(38):4002.
 35. Nicolette R, Secatto A, Pereira PAT, Soares EG, Faccioli LH. Leukotriene B4-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2009 Oct [cited 2016 Apr 26];34(4):365–9.
 36. Dos Santos DF, Bitencourt CS, Gelfuso GM, Pereira PAT, de Souza PRM, Sorgi CA, et al. Biodegradable microspheres containing leukotriene B(4) and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2011 Dec 18 [cited 2016 Apr 26];44(5):580–8.
 37. Trindade R a., Kiyohara PK, De Araujo PS, Bueno Da Costa MH. PLGA microspheres containing bee venom proteins for preventive immunotherapy. *Int J Pharm* [Internet].

-
- Elsevier B.V.; 2012;423(1):124–33.
38. Trindade R, Lima-Filho A, Reis M, Carvalho L, Veloso-Júnior PH, Melo AC. Influence of different excipients and protein characteristics on their susceptibility to microencapsulation process. *Int J Latest Res Sci Technol*. 2014;3(4):31–6.
 39. da Silva Bitencourt C, Gelfuso GM, Pereira PAT, de Assis PA, Tefé-Silva C, Ramos SG, et al. Hyaluronidase-Loaded PLGA Microparticles as a New Strategy for the Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2015;21(1-2):246–56.
 40. Bitencourt C da S, Silva LB da, Pereira PAT, Gelfuso GM, Faccioli LH. Microspheres prepared with different co-polymers of poly(lactic-glycolic acid) (PLGA) or with chitosan cause distinct effects on macrophages. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2016 Apr 26];136:678–86.
 41. da Silva Bitencourt C, Gelfuso GM, Pereira PAT, de Assis PA, Tefé-Silva C, Ramos SG, et al. Hyaluronidase-loaded PLGA microparticles as a new strategy for the treatment of pulmonary fibrosis. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 26];21(1-2):246–56.
 42. Singh J, Desai S, Yadav S, Narasimhan B, Kaur H. Polymer Drug conjugates: Recent Advancements In various Diseases. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2016 Feb 17 [cited 2016 Mar 19]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898741>
 43. de Jalón EG, Blanco-Príeto MJ, Ygartua P, Santoyo S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 2001 Sep 11 [cited 2016 Feb 17];226(1-2):181–4.
 44. Pitaksuteepong T, Somsiri A, Waranuch N. Targeted transfollicular delivery of artocarpin extract from *Artocarpus incisus* by means of microparticles. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft für Pharm Verfahrenstechnik eV* [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 Mar 19];67(3):639–45.
 45. Coelho EAF, Tavares CAP, Lima K de M, Silva CL, Rodrigues JM, Fernandes AP. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection. *Parasitol Res* [Internet]. 2006 May [cited 2016 Apr 26];98(6):568–75.

-
46. Trombone APF, Silva CL, Almeida LP, Rosada RS, Lima KM, Oliver C, et al. Tissue distribution of DNA-Hsp65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells. *Genet Vaccines Ther* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Apr 26];5:9.
 47. Minarini PRR, de Souza AO, Soares EG, Barata LES, Silva CL, Bentley MVLB. Antimycobacterial activity of 2-phenoxy-1-phenylethanone, a synthetic analogue of neolignan, entrapped in polymeric microparticles. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Apr 26];38(3):259–63.
 48. Nicolete R, Lima K de M, Júnior JMR, Baruffi MD, de Medeiros AI, Bentley MVLB, et al. In vitro and in vivo activities of leukotriene B4-loaded biodegradable microspheres. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Apr 26];83(1-2):121–9.
 49. dos Santos DF, Nicolete R, de Souza PRM, Bitencourt C da S, dos Santos RR, Bonato VLD, et al. Characterization and in vitro activities of cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum*-loaded biodegradable microspheres. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2009 Dec 8 [cited 2016 Apr 26];38(5):548–55.
 50. Nicolete R, dos Santos DF, Faccioli LH. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Apr 26];11(10):1557–63.
 51. Ribeiro AM, Souza ACO, Amaral AC, Vasconcelos NM, Jeronimo MS, Carneiro FP, et al. Nanobiotechnological approaches to delivery of DNA vaccine against fungal infection. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2016 Apr 26];9(2):221–30.
 52. Nicolete R, Lima K de M, Júnior JMR, Jose PJ, Sanz M-J, Faccioli LH. Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft für Pharm Verfahrenstechnik eV* [Internet]. 2008 Nov [cited 2016 May 2];70(3):784–90.
 53. Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regen Med* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 2];11(1):107–22.
 54. Wang Z, Hasan R, Firwana B, Elraiayah T, Tsapas A, Prokop L, et al. A systematic

-
- review and meta-analysis of tests to predict wound healing in diabetic foot. *J Vasc Surg* [Internet]. 2016 Feb [cited 2016 May 2];63(2 Suppl):29S – 36S.e2.
55. Raffetto JD. Pathophysiology of wound healing and alterations in venous leg ulcers-review. *Phlebology* [Internet]. 2016 Mar [cited 2016 May 2];31(1 Suppl):56–62.
56. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Health and the Economy. *Wound Repair Regen* 2009. 2010;17(6):763–71.
57. Pereira PAT, Bitencourt C da S, dos Santos DF, Nicolete R, Gelfuso GM, Faccioli LH. Prostaglandin D2-loaded microspheres effectively activate macrophage effector functions. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2015 Oct 12 [cited 2016 Mar 19];78:132–9.
58. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Feb 15];15(8):511–23.
59. Choi YH, Heo SC, Kwon YW, Kim HD, Kim SHL, Jang IH, et al. Injectable PLGA microspheres encapsulating WKYMVm peptide for neovascularization. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Jul 26 [cited 2015 Aug 25];
60. Fronza M, Caetano GF, Leite MN, Bitencourt CS, Paula-Silva FWG, Andrade T a. M, et al. Hyaluronidase Modulates Inflammatory Response and Accelerates the Cutaneous Wound Healing. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(11):e112297.
61. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* [Internet]. Jan [cited 2015 Oct 14];16(5):585–601.
62. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* [Internet].
63. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2016 Feb 26];15(11):599–607.
64. Sivamani RK. Eicosanoids and Keratinocytes in Wound Healing. *Adv Wound Care* [Internet]. 2014;3(7):476–81.
65. Gould LJ. Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application. *Adv wound care* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2016 Apr

-
- 5];5(1):19–31.
66. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* [Internet]. 2010 Mar [cited 2014 Jul 10];89(3):219–29.
67. Maderna P, Cottell DC, Berlasconi G, Petasis NA, Brady HR, Godson C. Lipoxins induce actin reorganization in monocytes and macrophages but not in neutrophils: differential involvement of rho GTPases. *Am J Pathol* [Internet]. 2002 Jun [cited 2015 Sep 24];160(6):2275–83.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 016/2014-1, sobre o projeto intitulado “*Avaliação da influência dos mediadores lipídicos PGD2, 15dPGJ2 e LXA4 encapsulados em micropartículas de PLGA na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Lúcia Helena Faccioli** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 17 de dezembro de 2014.

We certify that the protocol nº 016/2014-1, entitled “*Influence of lipid mediators PGD2, 15dPGJ2 and LXA4 encapsulated in PLGA microparticles healing of skin ulcers in rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/17/2014.

Ribeirão Preto, 17 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP