UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo Leucotrieno B₄ ou Prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmose murina

Roberto Nicolete

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo Leucotrieno B₄ ou Prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmose murina

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientado: Roberto Nicolete

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Ribeirão Preto
2008

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nicolete, Roberto

Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo Leucotrieno B₄ ou Prostaglandina E₂ em modelo de histoplasnose murina. Ribeirão Preto, 2008.

146 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. Mediadores lipídicos. 2. Microesferas biodegradáveis. 3. Imunomodulação.
4. Histoplasnose

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto Nicolete

Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo Leucotrieno B₄ ou Prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmoses murina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese à memória do meu querido irmão Christian. Aos meus pais José Roberto e Rosa Maria, pela confiança. Aos meus sogros Francisco e Helena, pelo apoio nos bastidores. De maneira especial à minha amada e amante esposa Larissa, cúmplice em todos os momentos de minha vida.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus e a todos que conscientemente ou não contribuíram para realização deste trabalho. De maneira especial agradeço:

À minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela confiança em mim depositada, desde quando cheguei no laboratório apenas com uma mochila nas costas, até os dias de hoje. Agradeço pelo aprendizado científico e pelas oportunidades que me foram proporcionadas.

À Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, por ter sido a primeira supervisora científica de meus projetos de Iniciação Científica. Obrigado pela paciência e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pela agradável amizade construída ao longo dos meus anos no laboratório, bem como pelos intrigantes diálogos envolvendo conceitos científicos e profissionais. Obrigado pelo seu carinho.

Aos colegas do laboratório, com os quais convivo no dia-a-dia e configuram a simbologia de um grupo de pesquisa. Quero lembrar de todos, desde a turma mais antiga até os recentes aqui mencionados: Bárbara, Bruno, Camila, Cláudia, Daiane, Daniela Carlos, Elyara, Fabiani, Franciele, Laís, Rômulo, Walter. Também quero lembrar dos alunos do Prof. Auro Nomizo. Obrigado a todos vocês! De maneira especial quero agradecer às alunas Adriana Secatto e Priscilla Aparecida Tartari Pereira, pela contribuição neste trabalho, referente aos experimentos de infecção com *H. capsulatum*.

Aos funcionários do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses Érika Vitaliano Garcia de Souza e Carlos Artério Sorgi, pelo apoio técnico em meus experimentos.

Aos pesquisadores Dr. José Maciel Rodrigues Júnior e Dra. Karla de Melo Lima, pelo aprendizado na confecção das microesferas e agradável convivência no início deste trabalho.

À Profa. Dra. María Jesús Sanz Ferrando, Universidade de Valência, Espanha, pela imensurável contribuição científica e agradável convivência durante o período de estágio desenvolvido naquele país.

Ao pesquisador Dr. Peter John Jose (Imperial College, Londres), que de forma muito carinhosa me acolheu na Universidade de Valência e contribuiu para meu amadurecimento científico.

À Profa. Dra. Cláudia Maffei, pela cepa de *Histoplasma capsulatum* cedida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Édson Garcia Soares e funcionária Ana Maria da Rocha (Departamento de Patologia-FMRP), pela confecção das lâminas de histologia.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pela disponibilização de seu laboratório para a confecção das microesferas e da sala de segurança nível 3 (P3), utilizada nos experimentos com o *H. capsulatum*. À funcionária do laboratório Ana Massom, pelo auxílio técnico e disposição.

Aos colegas de Pós-graduação e do departamento, pelos agradáveis momentos durante estes anos. Aos secretários da seção de Pós-graduação (Carlos, Rosana, Ana e Eleni), pela dedicação e competência com que me atenderam ao longo destes anos.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-RP, pela competência na manutenção e qualidade dos animais.

À FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Programa de Mobilidade Internacional da USP, patrocinado pelo banco Santander, o qual proporcionou a realização de parte dos estudos apresentados nesta tese na Universidade de Valência, Valência, Espanha.

**"O segredo é não correr atrás
das borboletas... É cuidar do
jardim para que elas venham
até você"
(Mário Quintana)**

RESUMO

NICOLETE, R. **Estudos sobre os efeitos da administração *in vivo* de microesferas biodegradáveis contendo Leucotrieno B₄ ou Prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmose murina**. 2008. 146f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Leucotrienos e prostaglandinas são metabólitos do ácido araquidônico que, além de mediadores da inflamação são importantes imunomoduladores da liberação de citocinas, nas respostas imune inata e adquirida. Embora estes mediadores apresentem potencial para serem utilizados como adjuvantes ou imunomoduladores da resposta imune, eles são altamente instáveis, dificultando o uso *in vivo*. Por esta razão, estas substâncias foram incorporadas em um sistema polimérico microestruturado. Este foi constituído de microesferas de quatro a seis micrômetros de diâmetro, contendo leucotrieno B₄ (LTB₄) ou prostaglandina E₂ (PGE₂) incorporados na matriz polimérica (PLGA). A caracterização *in vitro* das microesferas de PLGA, contendo LTB₄ ou PGE₂, foi feita através da determinação da morfologia e medida dos diâmetros médios, taxa de encapsulação e perfil de liberação *in vitro* dos mediadores. Além disso, foi avaliada a preservação da atividade biológica do LTB₄ liberado das microesferas, através do efeito do mesmo sobre a expressão de moléculas de adesão Mac-1 por citometria de fluxo. Também foram avaliadas a preservação da atividade biológica do LTB₄ e da PGE₂ liberados do interior das microesferas, através de estudos com microscopia intravital e a ativação de células endoteliais humanas (HUVECs e HUAECs). Realizamos ainda, ensaio de fagocitose com as microesferas contendo os dois mediadores encapsulados, utilizando macrófagos peritoneais murinos, além da avaliação da sobrevivência dos animais tratados intranasalmente com microesferas contendo LTB₄ ou PGE₂ durante a infecção pelo *H. capulatum*. Nestes animais, avaliamos a reação inflamatória pulmonar, o número de UFCs recuperadas dos pulmões e a modulação da resposta imune, através da quantificação de citocinas inflamatórias. Os estudos abordados neste trabalho revelaram achados interessantes e importantes quanto ao uso de microesferas biodegradáveis contendo mediadores lipídicos em situação de terapia, especialmente quando estes estão envolvidos em processos inflamatórios e/ou infecciosos.

Palavras-chave: Mediadores lipídicos; Microesferas biodegradáveis; Imunomodulação; Histoplasmose

ABSTRACT

NICOLETE, R. **Studies about the effects of the *in vivo* administration of Leukotriene B₄ or Prostaglandin E₂-loaded biodegradable microspheres on model of murine histoplasmosis.** 2008. 146f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Leukotrienes and prostaglandins are arachidonic acid metabolites, which participate in the inflammatory response and modulate cytokines release in both adaptive and innate immune responses. However, some physicochemical characteristics of these mediators, such as poor solubility in water and chemical instability, make them difficult to administer *in vivo*. In this study, we developed a polymeric microparticulate system for the encapsulation of lipid mediators. Regarding the *in vitro* characterization of the microspheres, we determined their diameters, evaluated the *in vitro* release of the mediators and the microspheres uptake by peritoneal macrophages. To assess the preservation of the biological activities of these mediators, we conducted intravital microscopy studies and determined the effect of LTB₄ and PGE₂-loaded biodegradable microspheres on inflammatory mediators release by murine peritoneal macrophages and human endothelial cells. In mice infected by *H. capsulatum*, we investigated the effects of intranasal administration of the microspheres on pulmonary inflammatory response. In this context, we analyzed the inflammatory cells recruited to the bronchoalveolar space, the mice survival and the number of CFUs recovered from the lungs after the administrations. We also assessed the cytokines release by the lung cells after the treatment with microspheres during the course of the infection. In conclusion, our findings showed that biodegradable microspheres could preserve the biological activity of the encapsulated mediators indicating their use as a new strategy to modulate cell activation, especially in the innate immune response.

Keywords: Lipid mediators; Biodegradable microspheres; Immunomodulation; Histoplasmosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da obtenção de microesferas pelo método de evaporação-extração do solvente.....	12
Figura 2. Célula de difusão vertical (célula de Franz) adaptada para os ensaios de liberação <i>in vitro</i>	13
Figura 3. Fotomicrografias eletrônicas de varredura das microesferas.....	28
Figura 4. Distribuição dos diâmetros obtidos para as microesferas.....	30
Figuras 5 e 6. Curvas de calibração dos padrões de LTB ₄ e PGE ₂	32
Figuras 7 e 8. Liberação acumulativa <i>in vitro</i> de LTB ₄ e PGE ₂ das microesferas.....	34
Figuras 9 e 10. Aplicação do modelo matemático de Higuchi no estudo de dissolução do LTB ₄ e PGE ₂ das microesferas.....	36
Figura 11. Fotomicrografias ilustrativas de macrófagos alveolares de camundongos 5-LO ^{-/-} , recuperados após as administrações intranasal de microesferas.....	37
Figura 12. Degradação do LTB ₄ encapsulado em microesferas quando submetido a diferentes temperaturas durante meses.....	38
Figura 13. Histogramas representativos da expressão de Mac-1 por células J774 incubadas com diferentes estímulos.....	43
Figura 14. Expressão de moléculas de adesão Mac-1 em células J774 murinas induzida pelas microesferas ou alíquotas de LTB ₄ liberadas das mesmas.....	44
Figura 15. Macrófagos peritoneais murinos que fagocitaram microesferas.....	46
Figura 16. Efeito da PGE ₂ liberada das microesferas sobre a produção de TNF- α por macrófagos.....	49
Figura 17. Produção de NO e expressão de PPAR- α por macrófagos peritoneais murinos.....	51
Figura 18. Número de células mononucleares e neutrófilos recuperados do LBA de camundongos 5-LO ^{-/-} após administração de diferentes estímulos.....	53
Figura 19. Cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos 5-LO ^{-/-} que receberam diferentes estímulos.....	54
Figura 20. Efeito da administração de LTB ₄ em solução ou encapsulado em microesferas sobre as respostas leucocitárias.....	56

Figura 21. Leucócitos em microcirculação e aderidos/emigrados após 4h da administração dos estímulos.....	59
Figura 22. Concentrações de NO ₂ ⁻ no sobrenadante de HUVECs após 4h de incubação com microesferas contendo LTB ₄	60
Figura 23. Concentrações de NO ₂ ⁻ no sobrenadante de HUAECs após 4 e 24h de incubação com microesferas contendo LTB ₄	61
Figura 24. Concentrações de NO ₂ ⁻ no sobrenadante de HUVECs após 4h de incubação com microesferas contendo PGE ₂	62
Figura 25. Concentrações de MCP-1 em sobrenadante de HUVECs e HUAECs após 4h de incubação com microesferas contendo LTB ₄	63
Figura 26. Concentrações de MCP-1 no sobrenadante de HUVECS após 4h de incubação com microesferas contendo PGE ₂	64
Figura 27. Número de células totais, mononucleares e neutrófilos recuperados do lavado broncoalveolar de camundongos 129 após infecção com <i>H. capsulatum</i>	75
Figura 28. Número de células totais, mononucleares e neutrófilos recuperados do lavado broncoalveolar de camundongos 5-LO ^{-/-} após infecção com <i>H. capsulatum</i>	77
Figura 29. Curva de sobrevivência de camundongos 129 e 5-LO ^{-/-} infectados i.t. com 3x10 ⁶ leveduras de <i>Histoplasma capsulatum</i>	79
Figura 30. Produção de citocinas em homogeneizado de pulmão de camundongos 129 e 5-LO ^{-/-} infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados com as microesferas.....	81
Figura 31. Fotomicrografias de cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos 129 infectados com <i>H. capsulatum</i> , tratados com microesferas.....	83
Figura 32. Fotomicrografias de cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos 5-LO ^{-/-} infectados com <i>H. capsulatum</i> , tratados com microesferas.....	84
Figura 33. Efeito da administração das microesferas sobre a multiplicação do <i>H. capsulatum</i> no pulmão de camundongos infectados.....	86
Figura 34. Número de células totais, mononucleares e neutrófilos recuperados do lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 após infecção com <i>H. capsulatum</i>	88
Figura 35. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados i.t. com 5 x 10 ⁵ leveduras de <i>Histoplasma capsulatum</i>	89

Figura 36. Produção de citocinas em homogeneizado de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados com *H. capsulatum* e tratados com as microesferas.....91

Figura 37. Fotomicrografias de cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados com *H. capsulatum*, tratados com microesferas.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Macrófagos peritoneais murinos incubados com microesferas contendo LTB ₄ fagocitam maior número de partículas.....	47
Tabela 2 – Macrófagos peritoneais murinos incubados com microesferas contendo PGE ₂ fagocitam menor número de partículas.....	48
Tabela 3 – Parâmetros hemodinâmicos da microcirculação cremastérica murina após injeção dos diferentes estímulos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-LO^{-/-} - Animais que não possuem o gene funcional (“knockout”) da enzima 5-lipoxigenase
- BHI- Meio de cultura com infusão de coração e cérebro
- BLTs- Receptores de ligação de leucotrienos
- BSA- Albumina de soro bovino
- COXs- Cicloxigenases
- ELISA- Ensaio Imunoenzimático
- Hc- *Histoplasma capsulatum*
- HUAECs- Células endoteliais provenientes de artérias de cordão umbilical humano
- HUVECs- Células endoteliais provenientes de veias de cordão umbilical humano
- IFN- γ - Citocina Interferon- γ
- IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12- Interleucinas 1 β , 2, 4 e 12
- i.t.- intratraqueal
- LBA- Lavado Broncoalveolar
- LPS- Lipopolissacarídeo
- LTs/LTB₄- Leucotrieno(s) B₄
- MAC-1- Antígeno tipo-1 de macrófago
- MAC-3- Antígeno tipo-3 de macrófago
- MCP-1- Proteína quimiotática de monócito tipo-1
- Mes- Microesferas
- NO- Óxido Nítrico
- PBS- Salina tamponada com fosfato
- PGs/PGE₂- Prostaglandina(s) E₂
- PLGA- Ácido poli (d,l)-lático co-glicólico
- PMN- Polimorfonucleares
- PPAR- α - Receptor proliferador-ativado de peroxissomos - α
- SBF- Soro bovino fetal
- SMF- Sistema mononuclear fagocítico
- TNF- α - Fator de necrose tumoral- α
- UFC- Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	iii
Lista de abreviaturas e siglas	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Preparo das soluções de leucotrienos e prostaglandinas	11
3.2 Obtenção das microesferas	11
3.3 Caracterização <i>in vitro</i> das microesferas	12
3.4 Detecção de LTB ₄ e PGE ₂ microencapsulados	14
3.5 Avaliação da expressão da molécula de adesão Mac-1 em células da linhagem J774 por citometria de fluxo	15
3.6 Animais	16
3.7 Obtenção e contagem total e diferencial das células do lavado broncoalveolar	16
3.8 Avaliação das atividades biológicas exercidas pelas microesferas sobre a fagocitose e ativação de macrófagos peritoneais murinos	17
3.9 Microscopia intravital	18
3.10 Condições experimentais dos animais submetidos ao estudo de microscopia intravital	19
3.11 Isolamento e cultura de células endoteliais humanas	20
3.12 Detecção da quimiocina MCP-1 por ELISA	20
3.13 Quantificação de nitritos em sobrenadante celular	21
3.14 Obtenção e cultivo de leveduras de <i>H. capsulatum</i> em meios sólido e líquido	21
3.15 Inoculação intratraqueal de leveduras de <i>H. capsulatum</i>	22

3.16 Administração intranasal das microesferas em camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i>	22
3.17 Histopatologia do pulmão de animais infectados e tratados com microesferas..	23
3.18 Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) do pulmão de animais infectados e tratados com microesferas.....	23
3.19 Quantificação de citocinas inflamatórias nos homogeneizados de pulmão dos animais infectados e tratados com microesferas.....	24
3.20 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS	25
PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS.....	26
PARTE II: AVALIAÇÃO DA PRESERVAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS MEDIADORES MICROENCAPSULADOS.....	42
PARTE III: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS MICROESFERAS NO MODELO DE INFECÇÃO POR <i>H. capsulatum</i>	73
5. CONCLUSÕES	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucotrienos e prostaglandinas nas infecções

Vários trabalhos têm demonstrado o importante papel de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) na regulação da resposta imune do hospedeiro, através da liberação de citocinas e quimiocinas. PGE_2 é um metabólito do ácido araquidônico (AA) produzido pela via das ciclooxigenases, por vários tipos celulares. Dentre as células do sistema imune, as células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas, produzem PGE_2 . Este mediador apresenta funções regulatórias na ativação de linfócitos T e na secreção de citocinas (SNIJDEWINT et al., 1993; BORGER et al., 1998). Snijdewint et al., (1993) demonstraram que a PGE_2 inibe, de modo dose-dependente, a produção de $\text{IFN-}\gamma$ por leucócitos do sangue periférico e linfócitos CD4^+ , aumenta a liberação de IL-5, mas não altera a de IL-4. Também, Borger et al., (1998) mostraram que a PGE_2 é um estímulo inibitório da expressão de RNAm para IL-5 em células T estimuladas com anticorpo anti-CD3. Porém, a PGE_2 induz efeito antagônico quando os linfócitos são estimulados com Concanavalina A. Ainda, este mediador lipídico inibe a produção de IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$ por macrófagos (KUNKEL et al., 1986), de IL-2 por linfócitos (SNIJDEWINT et al., 1993) e diminui a fagocitose, suprimindo a atividade microbicida das células “Natural Killer” (NK) (GOTO et al., 1983). PGE_2 inibe a produção de IL-12 por APCs estimuladas com LPS, mas aumenta a produção de IL-10 (TINEKE et al., 1995). Durante a fase de diferenciação das células T_H0 , PGE_2 inibe a expressão do receptor para IL-12 (IL-12R) e a diferenciação destes linfócitos para células do padrão T_H1 (KATAMURA et al., 1995; WU et al., 1998). Kuroda et al., (2000) mostraram que o efeito inibitório da PGE_2 sobre a produção de $\text{IFN-}\gamma$ por células esplênicas é mais evidente em camundongos BALB/c quando comparado com outras linhagens de animais e que este fenômeno é dependente da produção de IL-12p70 pelas APCs. Estes resultados indicam que o desenvolvimento da resposta T_H1 pode ser regulado negativamente pela produção de PGE_2 por macrófagos estimulados com LPS. Estudos clássicos mostraram que este mediador promove vasodilatação, extravazamento vascular, dor e pode regular a diferenciação de linfócitos B (CHACE et al., 1995). Sobre os efeitos anti-

inflamatórios das PGs, Zurier & Quagliata, (1971) demonstraram que estas reduzem a inflamação em modelos animais de artrite e nefrite. Também foi demonstrado que as PGEs possuem efeito terapêutico no controle da sepse em modelo animal e humano (EIERMAN et al., 1995). Ainda com relação aos efeitos biológicos exercidos pelas PGs, foi demonstrado que estes mediadores induzem a expressão de COX-2 em células endoteliais humanas (BUSTOS et al., 1997; CAMACHO et al., 1998).

Além das PGs, os LTs constituem outro grupo de mediadores lipídicos com importante atividade biológica. Estes são derivados dos metabólitos do AA, pela via da 5-lipoxigenase (5-LO). São secretados por diferentes células, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (SAMUELSSON, 1983; LEWIS & AUSTEN, 1984). Dentre estas células, destacam-se os macrófagos alveolares residentes, que são células responsáveis pela manutenção da esterilidade do espaço alveolar (LOHMANN-MATTHES et al., 1994) e cuja capacidade fagocítica, microbida e de síntese de LTs, excede àquela dos macrófagos de outros tecidos.

Com relação ao efeito do LTB₄ sobre linfócitos T, Morita et al., (1999) descreveram que células do baço, obtidas de camundongos normais, estimuladas com anti-CD3 na presença de antagonista do receptor de LTB₄, ONO-4057, proliferaram menos e secretaram menos IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-12.

LTs estão envolvidos na patogênese de uma grande variedade de desordens inflamatórias do pulmão, incluindo asma (O'BYRNE et al., 1997) e doenças infecciosas do trato respiratório (BURET & CRIPPS, 1993; BAILIE et al., 1996). Embora esteja bem estabelecido o papel dos LTs como ativadores celulares e fatores quimiotáticos para neutrófilos, eosinófilos, células mononucleares e linfócitos T (SHAK et al., 1983; FACCIOLI et al., 1991; MEDEIROS et al., 1999; TAGER et al., 2003), os estudos sobre o papel destes mediadores na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos ainda são incompletos. Alguns estudos revelaram alta concentração de LTB₄ no fluído do LBA de pacientes com pneumonia bacteriana (HOPKINS et al., 1989) e outros mostraram ainda que pacientes infectados pelo vírus influenza A (HENNET et al., 1992), hepatites A e B (KASIRGA et al., 1999) e vírus Epstein-Barr (EBV) (GOSSELIN et al., 2001) também apresentavam elevados níveis séricos de LTB₄. Atualmente, sabe-se que um dos mecanismos pelos quais LTB₄ participa

dos mecanismos de defesa é através da indução da liberação de dois peptídeos anti-HIV, α -defensinas e MIP-1 β (FLAMAND et al., 2004). Com relação aos efeitos biológicos do LTB₄ em células endoteliais humanas, foi demonstrado que o mesmo aumenta a expressão dos receptores BLTs em HUVECs, induzindo nestas a produção de derivados do óxido nítrico e quimiocina MCP-1 (QIU et al., 2006). Além disto, LTB₄ induz quimiotaxia e proliferação de células derivadas da artéria coronária humana (BACK et al., 2005). Outro aspecto biológico da molécula de LTB₄ é sua interação com receptores nucleares. Devchand et al., (1996) demonstraram que a molécula de LTB₄ é um ligante natural para o receptor nuclear PPAR- α e sugeriram, pela primeira vez, que a via PPAR- α - LTB₄ está envolvida no controle da inflamação.

A realização de experimentos utilizando camundongos que não possuem o gene funcional da enzima 5-lipoxigenase ("knockout", 5-LO^{-/-}) permitiu a investigação precisa do papel dos LTs nos diferentes processos de ativação celular. O aumento da susceptibilidade destes animais às infecções pulmonares também parece estar associado à deficiência da fagocitose e da atividade microbida dos macrófagos alveolares. Estudos utilizando antagonistas, inibidores da síntese de LTs e mais recentemente, animais 5-LO^{-/-}, sugerem importante papel imunomodulatório destes mediadores na síntese de diferentes mediadores nos processos infecciosos e parasitários (LOHMANN-MATTHES et al., 1994, revisado por PETERS-GOLDEN & COFFEY, 1998; MEDEIROS et al., 2004; MACHADO et al., 2005). Medeiros et al., (2004) demonstraram que a inibição farmacológica de LTB₄ em animais infectados com *H. capsulatum* diminui a sobrevivência dos mesmos, aumentando a carga fúngica nos pulmões e no baço. Além disso, Chen et al., (2001), utilizando animais 5-LO^{-/-}, descreveram que LTs têm importante função no controle da replicação do vírus da estomatite vesicular (VSV), na encefalite experimental. Alguns autores têm sugerido ainda a participação dos LTs e PGs na formação e manutenção de granulomas (DE ROSE et al., 1997), como aqueles induzidos por polímeros isolados da parede celular de *Streptococcus* sp (YOSHINO, 1995).

Outra potencial fonte de mediadores lipídicos pode ser o próprio patógeno. A produção de LTs e PGs por fungos está envolvida,

respectivamente, com o aumento da resposta inflamatória e a regulação negativa da resposta imune protetora do padrão T_H1 . Estes dados sugerem que a produção de eicosanóides pelos fungos tem participação na virulência, favorecendo o desenvolvimento de infecções crônicas. Noverr et al., (2001) mostraram que fungos patogênicos como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* produzem PGs, as quais além de serem essenciais para a viabilidade destes fungos, podem modular a resposta imune do hospedeiro. Estes pesquisadores demonstraram que células totais de baço incubadas com PGE_2 produzida pelo fungo liberaram menos $TNF-\alpha$ e mais IL-10, quando comparadas com células incubadas apenas em meio de cultura. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que outros fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus*, *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. e *Rhizomucor pusillus* produzem PGs e LTs. Além disto, a produção destes mediadores é aumentada com a adição de AA exógeno na cultura, sugerindo que estes fungos têm a capacidade de converter este substrato nos produtos derivados das vias da lipoxigenase e cicloxigenase (NOVERR et al., 2002).

1.2 Histoplasmose e a resposta imune

A histoplasmose tem ampla distribuição pelo mundo, sendo a maior incidência no oeste dos E.U.A, México, Chile e Brasil. No Brasil, esta micose é endêmica em todas as regiões, sendo que inquéritos epidemiológicos demonstraram maior incidência nas regiões sudeste, centro-oeste e norte (COSTA et al., 1994). Esta é uma doença infecciosa causada pelo *H. capsulatum*, um fungo dimórfico, parasita intracelular, não encapsulado. O dimorfismo celular do fungo caracteriza-se pela forma saprófita miceliana à temperatura ambiente (25°C) e pela forma de levedura à temperatura do corpo dos mamíferos (37°C). Os conídios do *H. capsulatum* encontram-se em fezes de pássaros e morcegos, motivo pelo qual a histoplasmose também é conhecida como “doença das cavernas”. Os mamíferos contraem a infecção pela inalação de conídios que alcançam os alvéolos pulmonares onde são fagocitados por macrófagos alveolares ou neutrófilos que migram para o local da infecção (MEDOFF et al., 1987).

Em indivíduos imunocompetentes, durante a primeira semana de infecção, ocorre intenso infiltrado de polimorfonucleares (PMNs) no pulmão, seguido de infiltrado de células mononucleares e formação de granulomas compactos. A forma assintomática da infecção nestes indivíduos evolui para cura espontânea (ARTZ & BULLOCK, 1979). No entanto, 5% dos indivíduos imunocompetentes manifestam a forma sintomática da infecção, nos quais a histoplasmose pulmonar aguda progride para a forma crônica, que pode ou não evoluir para forma disseminada. Estudos sobre o papel de citocinas em doenças micóticas vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar as funções destas no recrutamento de células para o foco inflamatório, assim como nos mecanismos de defesa do hospedeiro, como fagocitose e atividade microbicida (DEEPE & BULLOCK, 1990; MURPHY et al., 1994). Vários trabalhos têm demonstrado que citocinas, como a IL-12, liberada predominantemente por macrófagos e células dendríticas, e IFN- γ , secretado por células NK e linfócitos T_H1 (MOSMANN & SAD, 1986), são importantes na resposta imune em camundongos infectados com *H. capsulatum*. Embora seja necessário um sinal adicional para ativação celular, estudos *in vitro* têm demonstrado que IFN- γ ativa macrófagos peritoneais murinos e esta ativação inibe o crescimento intracelular do *H. capsulatum* (LANE et al., 1993).

A resposta imune efetiva contra o *H. capsulatum* compreende a indução da imunidade adaptativa, através da interação entre os macrófagos infectados pelo fungo e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (ALLEENDOERFER et al., 1999; DEEPE, 1994). Tal fato resulta em aumento dos níveis das citocinas do padrão T_H1 e a interação entre estas leva ao aumento de IL-12, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, envolvidas na resposta imune protetora contra o fungo (ALLEENDOERFER & DEEPE, 1997; DEEPE et al., 1999). Além destas citocinas, Medeiros et al., (2004) demonstraram o papel dos LTs na resposta imune primária contra a histoplasmose. Estes autores mostraram que os animais infectados com inóculos sub-letais de Hc, tratados com MK886, um potente inibidor da síntese de LTs, tiveram 100% de mortalidade quando comparados com os animais somente infectados com o fungo. Além disto, a ausência de LTs durante a infecção levou a um aumento da carga fúngica nos pulmões e no baço destes

animais, assim como a uma diminuição nos níveis das citocinas IL-2, IL-5, IL-12 e IFN γ .

1.3 Sistemas de Liberação de Drogas

Dentre os inúmeros sistemas de liberação de drogas, aqueles que empregam carreadores poliméricos são de grande interesse, pois podem aumentar a resposta imune específica, uma vez que são capazes de direcionar de maneira seletiva, o antígeno ou vetor gênico para as células imunoefetoras (LIMA et al., 2003). Esta tecnologia possibilita o uso de sistemas poliméricos biodegradáveis capazes, não somente de direcionar o antígeno, mas também de permitir a liberação controlada da substância encapsulada (ELDRIDGE et al, 1991; LIMA & RODRIGUES JR, 1999; LIMA et al., 2000). A aplicação desta tecnologia tem permitido a exploração de estratégias inovadoras no campo da imunização e desenvolvimento de vacinas (SILVA et al., 2000; LIMA et al, 2001; FRANCO et al., 2008), bem como de novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, tivemos como proposta a utilização de um sistema polimérico microparticulado composto por microesferas de quatro a seis micrômetros de diâmetro. Este sistema, contendo LTs ou PGs incorporados na matriz polimérica permite a veiculação destes mediadores, com o objetivo de avaliar as atividades biológicas *in vivo*, em posterior situação de terapia.

Muitos dos processos de microencapsulação descritos são basicamente modificações de três técnicas: evaporação-extração do solvente, coacervação e “spray-drying” (AFTABROUCHAD & DOELKER, 1992). O método de evaporação-extração do solvente permite a formação de nano e micropartículas sem a necessidade de temperaturas elevadas ou agentes separadores de fases. Dentre os inúmeros polímeros naturais (BSA, gelatinas, colágenos, etc.) e sintéticos (poli/aminas, amidas, uretanos, acrilamidas, etc.) disponíveis para o uso em sistemas de liberação de drogas, um dos mais utilizados são aqueles constituídos por poli-ésteres dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), por apresentarem como vantagens a biocompatibilidade e a biodegradabilidade (GILDING & REED, 1979; WU, 1995). A liberação da substância encapsulada neste tipo de polímero é proporcional à velocidade de hidrólise do mesmo, o que permite o desenvolvimento de sistemas nano e microparticulados e, dependendo do método de preparo, encapsular

substâncias hidrofílicas e lipofílicas ou ainda, mais de uma substância na mesma formulação. Além disso, este polímero permite a liberação controlada e/ou sustentada das substâncias encapsuladas e não induz reações adversas no sítio de administração. Utilizando o PLGA como sistema matricial, é possível estimar o tempo de liberação da substância encapsulada, através da variação entre as porcentagens de ácido láctico e glicólico empregadas. Outro fato importante é que os polímeros derivados do ácido láctico são mais hidrofóbicos que os derivados do ácido glicólico (COHEN et al., 1994; WU, 1995), o que permite a adequação de diferentes taxas de encapsulação, baseada na característica química da molécula alvo do processo. No organismo, estes polímeros são hidrolisados e uma vez degradados, liberam o ácido láctico e o glicólico, que são substratos inócuos (BAZILE et al., 1992). As potencialidades para o uso destes sistemas encapsulados são devidas à: (i) proteção do composto a ser administrado, possibilitando redução na quantidade utilizada e aumento da estabilidade dos mesmos *in vitro* e *in vivo*; (ii) interação com células do Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), uma vez que partículas com diâmetro inferior a 10 μm são fagocitadas de maneira eficiente por macrófagos (ELDRIDGE et al., 1991; O'HAGAN et al., 1993), o que pode contribuir para o desencadeamento e/ou modulação das respostas imune inata ou adquirida; (iii) possibilidade de administração dos compostos por diferentes vias como intranasal, intratraqueal, endovenosa ou intramuscular, podendo ser realizados estudos sistêmicos e/ou locais; (iv) facilidade de administração; (v) estabilidade, uma vez que as microesferas são armazenadas sob a forma de um pó liofilizado que pode ser reconstituído imediatamente antes da administração.

Com relação ao desenvolvimento de sistemas microparticulados, contendo mediadores lipídicos como moléculas bioativas, nenhum estudo abordou, até o momento, o emprego desta tecnologia em situação de terapia. Neste contexto, estudos envolvendo a administração de microesferas biodegradáveis contendo mediadores lipídicos em modelos de doenças inflamatórias e/ou infecciosas são de grande importância para o estabelecimento de futuras terapias, especialmente quando estas formulações puderem ser associadas a quimioterápicos, classicamente empregados no tratamento destas doenças.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

1. O desenvolvimento e a caracterização de microesferas poliméricas biodegradáveis, contendo LTB₄ ou PGE₂;
2. A avaliação *in vitro* e *in vivo* das atividades biológicas dos mediadores microencapsulados, bem como do potencial terapêutico quando administrados em camundongos infectados pelo *H. capsulatum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo das soluções de leucotrienos e prostaglandinas

Leucotrieno B₄ (LTB₄) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (soluções estoque) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO., USA) foram dissolvidos em etanol absoluto (J.T. Baker/Mallinckrodt, Phillipsburg, N.J., USA), nas concentrações de 100 µg/mL ($3,0 \times 10^{-4}$ M) e 1 mg/mL ($3,0 \times 10^{-3}$ M), respectivamente. A partir destas soluções foram feitas as diferentes diluições empregadas no preparo das microesferas.

3.2. Obtenção das microesferas

As microesferas foram obtidas pelo método da emulsão e evaporação do solvente (NIWA et al., 1993). Brevemente, a fase orgânica contendo o solvente orgânico diclorometano (10 mL) (J.T. Baker/Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA), os mediadores lipídicos (300 µL de LTB₄ ou PGE₂ em solução) e o polímero PLGA (Resomer RG 505, MM 78 Kda) (30 mg), composto de 50% de ácido láctico e 50% de ácido glicólico (Boehringer Ingelheim-Ingelheim, Alemanha) foi vertida em uma fase aquosa contendo tensoativo (PVA 3% m/v, 30 mL) (Mowiols 40–88, Sigma-Aldrich). Após a mistura das fases em homogeneizador (RW20; IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha) a 600 rpm por 4h para extração do solvente orgânico. A microemulsão foi obtida após sucessivas lavagens com água bi-destilada e esterilizada, seguida de centrifugação (3.000 x g, 5 min., 20 a 25°C). Em seguida, a amostra foi congelada a -80°C e liofilizada. Microesferas sem a incorporação dos mediadores foram utilizadas como controle. O esquema descrito a seguir ilustra a obtenção das microesferas:

Figura 1. Representação esquemática da obtenção de microesferas pelo método de evaporação-extração do solvente.

Para cada lote de microesferas produzido foi realizado teste para detecção de LPS (kit comercial LAL, Cambrex Bioscience Inc., Walkersville, MD, EUA). Todas as amostras analisadas apresentaram valores de Unidades de Endotoxina (UE) abaixo da faixa de linearidade do método (0,1 a 1 UE/mL).

3.3 Caracterização *in vitro* das microesferas

- A distribuição dos diâmetros médios das microesferas foi determinada após reconstituição das mesmas em água, por difratometria a laser em um granulômetro SALD- 2101 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), pertencente ao laboratório de Vacinas Gênicas, FMRP-USP;
- A forma e topografia das microesferas foram observadas utilizando microscópio eletrônico de varredura (Jeol scanning microscope JSM 5200, Tokyo, Japão), pertencente ao Departamento de patologia, FMRP-USP;

- A taxa de encapsulação das microesferas contendo LTB_4 ou PGE_2 foi determinada pelo método de ELISA (Kit comercial EIA- $\text{LTB}_4/\text{PGE}_2$, Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA) (item 3.4);
- Após a determinação da concentração dos mediadores encapsulados nas microesferas, avaliamos o perfil de liberação *in vitro*. Para os ensaios envolvendo as microesferas contendo os mediadores, foram utilizadas células de difusão Microette-HANSON RESEARCH CO. (célula de difusão vertical ou célula de Franz, empregada em estudos *in vitro* de permeação cutânea), conforme o esquema seguinte:

Figura 2. Célula de difusão vertical (célula de Franz) adaptada para os ensaios de liberação *in vitro*.

As amostras avaliadas (microesferas contendo LTB_4 ou PGE_2) foram devidamente pesadas (5 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 termostatzado 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 μm), sendo que alíquotas de 300 μL 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, 2, 4, 10, 12, 18 e 24 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:

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

Os estudos de cinética de liberação *in vitro* foram conduzidos tendo como base o modelo de dissolução de Higuchi (HIGUCHI, 1970).

- Os estudos de estabilidade das microesferas contendo LTB_4 foram conduzidos em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Pierre Borgeat (Rheumatology and Immunology Research Center, Sainte-Foy, Quebec, Canadá), conforme condições experimentais descritas (Anexo A).

3.4 Detecção de LTB_4 e PGE_2 microencapsulados

Foram realizadas as quantificações de LTB_4 e PGE_2 liberados das microesferas por ensaio imuno-enzimático de competição, de acordo com instruções do fabricante (EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, N.J., USA). Resumidamente, foram adicionados 50 μL de cada amostra em placas com 96 poços fornecidas pelo fabricante, junto com anticorpo específico anti- LTB_4 ou PGE_2 . Após 2 horas em temperatura ambiente sob agitação orbital, as placas foram lavadas em lavadora automática de ELISA (ELx 50, Biotek Instruments Inc.). Foram adicionados aos poços 50 μL dos eicosanóides específicos a cada ensaio, conjugados com enzima peroxidase, caracterizando o ensaio de competição. As placas foram incubadas sob agitação em temperatura ambiente por 1h. Após incubação e lavagem da placa, foi adicionado aos poços o substrato de revelação TMB, seguido de incubação por 30 minutos sob agitação em temperatura ambiente. A reação foi bloqueada por adição de 100 μL de H_2SO_4 1M e as absorbâncias foram determinadas em leitor de

ELISA em 450 nm (uQuant, Biotek Instruments Inc.). O preparo das amostras envolveu a destruição das microesferas controle ou contendo os mediadores em Acetonitrila/ Etanol 7:3, volume final de 1 mL. Em seguida, os solventes foram evaporados das amostras em “speed vacuum” e estas ressuspensas em 50 µL do tampão EIA (tampão diluente para todas as amostras). Foram preparadas amostras puras e diluídas 1000 vezes (para análise do LTB₄) ou amostras puras e diluídas 10 e 100 vezes (para análise da PGE₂). A curva padrão de LTB₄ variou de 6,2 a 800 pg/mL e a de PGE₂, de 50 a 6.400 pg/mL.

3.5 Avaliação da expressão da molécula de adesão Mac-1 em células da linhagem J774 por citometria de fluxo

Macrófagos murinos da linhagem J774 (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK) foram incubados tanto com as microesferas contendo LTB₄ encapsulado, como com as alíquotas contendo o mediador, provenientes do ensaio de liberação *in vitro*. As células foram mantidas em meio RPMI completo (10% soro bovino fetal e 0,1% de antibiótico) a 37°C, 5% CO₂, por 4h. As mesmas foram lavadas com meio RPMI-completo e coletadas após centrifugação (400 x g, 15 min., 10°C). A suspensão de células foi acertada para 1 x 10⁶ céls./mL, em câmara de Neubauer. A viabilidade celular também foi avaliada, utilizando-se o corante de exclusão Azul de Tripán. Células foram utilizadas quando a viabilidade foi superior a 90%. A seguir, foram adicionados 160µL desta suspensão e 50 µL de cada amostra avaliada (microesferas ou alíquotas de liberação *in vitro*) em cada poço de uma microplaca (96 poços). Após o período de incubação (4h), foi adicionado em cada poço da placa tampão (PBS 0,15 M/0,2% NaN₃/1% soro bovino fetal) e, em seguida, o volume de cada poço foi transferido para os tubos de leitura e centrifugado (400 x g, 5 min., 4°C). Foram adicionados a cada tubo os anticorpos anti- CD11b/CD18 (Mac-1), marcados com PerCP e anti- Mac-3, marcados com FITC, seguida da incubação em geladeira por 40 min. Foram realizadas sucessivas lavagens com tampão e posterior análise da expressão de moléculas de adesão Mac-1 por citometria de fluxo, utilizando o equipamento “FACSCalibur” (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e para aquisição e análise dos dados, o software “Cell Quest”. A marcação das células com anticorpos anti- Mac-3 foi realizada para distinguir os macrófagos,

minimizando possíveis equívocos com relação à análise da população de microesferas que estavam presentes nas “gates”. Como controle negativo da expressão das moléculas de adesão foram utilizadas células apenas incubadas com meio de cultura. Já como controle positivo da expressão de Mac-1 foi utilizado LTB₄ em concentração semelhante àquela contida nas microesferas.

3.6 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos pertencentes às linhagens sv129 (“background” selvagem), 129-Alox5 (5-LO^{-/-}), os quais tiveram o gene da enzima 5-lipoxigenase deletado, e C57BL/6, pesando entre 15-20 g, todos provenientes do Biotério de Criação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Ribeirão Preto-USP e mantidos em isoladores com livre acesso à água e alimento. Os animais infectados com *H. capsulatum* foram mantidos em isoladores, dentro da sala de biossegurança nível 3, no Laboratório de Vacinas Gênicas (Núcleo de Pesquisa em Tuberculose), Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP, com livre acesso à água e alimento, com ciclo de luz e controle de temperatura. Para os experimentos com microscopia intravital foram utilizados camundongos C57BL/6 (Charles River Laboratories, L’Arbresle, France), pesando entre 20-30 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de Valência, Espanha, com livre acesso à água e alimento e mantidos em condições específicas de ausência de patógenos. Todos os experimentos foram conduzidos dentro das normas éticas e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (PCARP), da Universidade de São Paulo (protocolo n. 05.1.483.53.9, Anexo B).

3.7 Obtenção e contagem total e diferencial das células do lavado broncoalveolar

Para a obtenção das células do LBA envolvendo os experimentos com animais 5-LO^{-/-} não infectados foram separados quatro grupos de animais que receberam 100 µL i.t. das seguintes soluções: PBS estéril, solução de LTB₄ (3×10^{-8} M), microesferas controle ou contendo LTB₄ (5×10^{-7} M). Foi também

utilizado um grupo de animais não submetidos às condições do estudo (“naïve”). Neste experimento também foram reservadas as células do LBA dos camundongos que receberam as microesferas controle para análise microscópica da distribuição das microesferas ao longo do trato respiratório.

Os animais 129 e 5-LO^{-/-} infectados com o fungo e tratados com as microesferas de LTB₄ ou PGE₂ 1, 4, 7 e 10 dias após a infecção foram divididos da seguinte maneira: grupo infectado, grupo infectado e tratado com as microesferas controle ou contendo os mediadores.

Após 1, 4, 7 e 10 dias das administrações (experimento com os animais 5-LO^{-/-} não infectados) ou 14 dias da infecção com *H. capsulatum* (animais infectados e tratados com as microesferas), os animais foram sacrificados em uma câmara com mistura dos gases CO₂ e O₂. As células do LBA foram coletadas através da inserção de um catéter acoplado a uma seringa contendo 1 mL de solução de PBS estéril com 5 U/mL de heparina. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular em um único tubo. O exsudato foi coletado individualmente de cada animal e adicionado separadamente em tubos plásticos. A contagem do número total de células presentes nos lavados foi feita empregando solução de Turk e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas em esfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Souther Products Ltd., Cheshire, UK) e submetidas à coloração panótica (Panótico rápido, Laborclin Ltda., Paraná, Brasil).

3.8 Avaliação das atividades biológicas exercidas pelas microesferas sobre a fagocitose e ativação de macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos 129 mortos em câmara de CO₂. A cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS/citrato e as células obtidas foram centrifugadas a 400 × g, 10 minutos. A suspensão de células foi ajustada para 6 × 10⁵ céls./poço e alíquotas de 1 mL foram adicionadas em placas de 24 poços, incubadas “overnight” (37°C, 5% CO₂) para favorecer a adesão celular. As células não aderidas à placa foram

removidas por lavagem com meio RPMI-1640 completo, contendo 10% de SBF.

Para os experimentos de fagocitose, as células foram incubadas por 2 horas (37°C, 5% CO₂) com suspensões de 1 mg/mL de microesferas controle ou contendo os mediadores LTB₄ ou PGE₂, ressuspensas em meio de cultura (RPMI-1640, contendo 10% de SBF). Após o período de incubação (2h), o meio de cultura foi aspirado para a remoção das microesferas não fagocitadas. As células foram identificadas por coloração panótica e as microesferas fagocitadas foram visualizadas microscopicamente. O ensaio de inibição física da fagocitose a 4°C não revelou nenhuma partícula fagocitada. A porcentagem de macrófagos que ingeriram pelo menos uma microesfera e também o número de microesferas fagocitadas por célula foram determinados por microscopia de campo claro, aumento de 1000x.

Outros experimentos foram realizados com os macrófagos peritoneais incubados previamente (1h) com 2 mg das microesferas controle, contendo PGE₂ ou PGE₂ em solução (3×10^{-7} - 10^{-8} M) e estimulados com LPS (0,5 µg/mL). Após 2h de incubação (37°C, 5% CO₂), os sobrenadantes foram coletados e reservados para quantificação da citocina TNF-α produzida pelas células, por ELISA.

Os experimentos envolvendo a detecção do receptor nuclear PPAR-α por *Western blot* foram conduzidos em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Maria Jesús Sanz Ferrando, da Universidade de Valência, Espanha, conforme metodologia descrita (Anexo C, trabalho publicado: "Leukotriene B₄-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation").

3.9 Microscopia intravital

Camundongos machos foram anestesiados com uma mistura de ketamina (50 mg/mL) e cloridrato de medetomidina, 3:2 (v/v), injetados i.p (200 µL). O camundongo foi colocado em posição supino em um pedestal próprio para a visualização microscópica e mantido aquecido com um banho termostatizado a 37°C. O preparo do músculo cremaster consistiu em romper longitudinalmente a pele da bolsa escrotal, removendo o tecido conjuntivo até a exposição do testículo. Este foi isolado do escroto e colocado sobre a lâmina

histológica do pedestal, sendo deste momento em diante constantemente irrigado com tampão bicarbonato-salina (em g/L: 7,82 NaCl; 0,35 KCl; 0,147 MgSO_4 e 1,679 NaHCO_3 , pH 7,4) a 37°C. O mesentério testicular com seus vasos foi cauterizado para separar o músculo do conteúdo da bolsa. Suturas foram feitas nas extremidades do músculo para estirá-lo e estas foram presas ao pedestal com fitas adesivas.

A visualização do tecido foi feita em um microscópio ortostático (Nikon Optiphot-2, SMZ1, Badhoevedorp, Holanda), equipado com lentes objetivas (20 e 50x) (Nikon SLDW, Badhoevedorp, Holanda) e oculares (10x). Foram selecionadas vênulas de diâmetros entre 25 e 40 μm , medidos através de um vídeo calibrador (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, Texas, USA). A velocidade dos eritrócitos na microcirculação foi medida através de um velocímetro óptico de Doppler (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, Texas, USA). Uma câmera de vídeo (Sony SSC-C350P, Koeln, Alemanha) foi acoplada ao microscópio para visualização das imagens em um monitor de televisão (Sony Trinitron PVM-14N2E, Alemanha). As imagens foram capturadas em videocassete (Sony SVT-S3000P, Alemanha) para análise em “playback” do fluxo dos leucócitos em fase de rolamento, velocidade em fase de rolamento, adesão e emigração (aumento final da imagem de 1300x). O fluxo sanguíneo e as forças físicas resultantes do mesmo sobre as paredes dos vasos (“shear rate”) foram calculados conforme descrito (HOUSE & LIPOWSKY, 1987).

3.10 Condições experimentais dos animais submetidos ao estudo de microscopia intravital

Após a conclusão da preparação cirúrgica e 30 minutos adicionais para estabilização, foram obtidos os parâmetros hemodinâmicos e as medidas da microscopia intravital basal (fluxo em fase de rolamento, velocidade em fase de rolamento, adesão e emigração leucocitárias). Os animais submetidos ao estudo receberam injeção intraescrotal (100 μL , testículo direito) dos diferentes estímulos, como descrito a seguir: animais injetados com solução fisiológica estéril (grupo salina); animais injetados com solução de LPS 0,05 $\mu\text{g/kg}$ (grupo LPS); animais injetados com 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de LTB_4 em solução (grupo sol. LTB_4);

animais injetados com suspensão de 1 mg/mL de microesferas controle ou contendo LTB₄ (grupos Mes controle ou Mes LTB₄, respectivamente). Depois de 4h das administrações, foram registrados os seguintes parâmetros: fluxo, velocidade, adesão e emigração leucocitários, durante 5 min. Após o término, os animais foram mortos com dose excessiva do anestésico.

3.11 Isolamento e cultura de células endoteliais humanas

Células endoteliais provenientes de veias e artérias de cordão umbilical humano (HUVECs e HUAECs, respectivamente) foram isoladas por tratamento com collagenase (JAFFE et al., 1973) e mantidas em meio específico para células endoteliais humanas (EBM-2 suplementado com EGM-2 e 10% de SBF) (Clonetics, Barcelona, Espanha). Células provenientes do segundo passo de tripsinização foram adicionadas em placas de cultura de 24 poços. Quando as células atingiram a confluência necessária (> 90%) para a realização dos experimentos, estas foram incubadas por 16 horas em meio de cultura contendo 1% SBF. Para a indução da liberação de quimiocinas e NO, as células foram estimuladas com as microesferas (controle, contendo LTB₄ ou PGE₂), sendo adicionadas suspensões de 1 mg/mL destas em cada poço da placa, em um volume de 700 µL de meio. LTB₄ (0,2 µg/mL) e PGE₂ (5 µg/mL) em solução também foram adicionados em diferentes poços. Após 4 ou 24 horas de incubação das células em estufa de 5% CO₂, a 37°C, foram coletados os sobrenadantes de cultura e os mesmos foram armazenados em freezer -20°C, até o momento da quantificação da quimiocina MCP-1 por ELISA ou de nitritos pelo método de Griess.

3.12 Detecção da quimiocina MCP-1 por ELISA

A concentração da quimiocina MCP-1 nos sobrenadantes de cultura das células endoteliais humanas foi determinada por ELISA. Após incubação das placas de 96 poços por 18h à temperatura ambiente com anticorpos anti-MCP-1 (R&D Systems, Madri, Espanha), as mesmas foram lavadas 4 vezes (200 µL/poço) com tampão de lavagem constituído de PBS/0,2% de Tween (Sigma, St. Louis, MO). Após as sucessivas lavagens e secagem da placa, foram adicionados 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA (GIBCO BRL,

Grand Island, NY, USA) (tampão de bloqueio), seguido de incubação à temperatura ambiente no mínimo por 1h. As amostras diluídas da curva padrão ou dos sobrenadantes celulares foram adicionadas à placa (100 µL/poço) e incubadas por 2 h. Depois de repetido o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 µL/poço dos anticorpos biotinilados para detecção da quimiocina, empregando a concentração indicada pelo fabricante. Após 2h de incubação, foi adicionada neutravidina-horseradish peroxidase (Perbio Science, Cheshire, UK), diluída em tampão de bloqueio. A placa foi incubada por 1h à temperatura ambiente e, após as lavagens, foram adicionados 100 µL/poço da solução de substrato, contendo H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB) (Neogen, Lexington, KY). As placas foram incubadas por 20-30 minutos à temperatura ambiente e a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,19 M). A densidade óptica (D.O.) foi avaliada em leitor de microplacas com filtro de 450 nm (Metertech Inc., modelo 960) e a concentração de quimiocina calculada a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos como pM de MCP-1 no sobrenadante celular. A sensibilidade do método foi > 10 pg/mL.

3.13 Quantificação de nitritos em sobrenadante celular

Após 4 horas de incubação dos macrófagos peritoneais murinos, ou ainda, 4 e 24 horas após incubação das HUVECs e HUAECs com as microesferas ou soluções de LTB₄ e PGE₂, foram quantificadas as concentrações de nitritos no sobrenadante destas células, através da reação de Griess. Como reagentes desta reação foram utilizados: sulfanilamina 1%; di-hidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%; H₃PO₄ 2,5% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO., USA).

3.14 Obtenção e cultivo de leveduras de *H. capsulatum* em meios sólido e líquido

A cepa selvagem do *H. capsulatum* foi isolada a partir do sangue de um paciente acompanhado clinicamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e com diagnóstico positivo para histoplasmose, empregando histoplasmina. As amostras foram mantidas na fase filamentosa ou micelar, à temperatura ambiente (25°C) em

Agar Sabouraud (Difco, Detroit, Michigan). Para obtenção de leveduras, os fungos foram convertidos a partir da forma miceliana, através do cultivo a 37°C em estufa úmida 5% de CO₂ em meio sólido de infusão de coração e cérebro (Difco, Detroit, Michigan) acrescido de 1% de Agar, 0,01% de L-cisteína (Acros Organics, New Jersey, USA), 0,03% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MA) e 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após 21 dias de incubação, as leveduras foram obtidas. Alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) (CALICH et al., 1979). As amostras foram utilizadas somente quando a viabilidade do fungo foi superior a 90%.

3.15 Inoculação intratraqueal de leveduras de *H. capsulatum*

Os animais foram anestesiados i.p. com 2,2,2-Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA), na concentração de 2,5% em PBS, na dose de 250 mg/kg de animal. Para a inoculação das leveduras de *H. capsulatum*, os animais anestesiados tiveram suas traquéias expostas, sendo inoculados i.t. 100 µL de PBS, contendo uma suspensão de 3×10^6 leveduras/animal (inóculo letal) nos camundongos 129 e 5-LO^{-/-}, e 5×10^5 leveduras/animal (inóculo subletal) nos camundongos C57BL/6. Animais que foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam 100 µL de PBS estéril foram utilizados como controle.

3.16 Administração intranasal das microesferas em camundongos infectados com *H. capsulatum*

Os camundongos 129 e 5-LO^{-/-}, infectados com o inóculo letal do fungo, foram tratados intranasalmente com 20 µL (10µL/narina) de uma suspensão aquosa contendo 10 mg/mL de microesferas controle ou contendo LTB₄, ressuspensas em PBS estéril. Animais C57BL/6, infectados com inóculo subletal do fungo, receberam intranasalmente microesferas controle ou contendo PGE₂. Os animais receberam a formulação 1, 4, 7 e 10 dias após a infecção. Animais que receberam apenas PBS (veículo das formulações) foram utilizados como controle.

3.17 Histopatologia do pulmão de animais infectados e tratados com microesferas

Os fragmentos dos pulmões, removidos por ocasião da morte dos animais, foram fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 24 horas, e em seguida submetidos ao processo de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol. Os tecidos foram incluídos em blocos de parafina e em seguida realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Em seguida, lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao 80%). Os cortes reidratados foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de infiltrado inflamatório e celularidade e com metenamina argêntica (método de Gomori-Grocott (GMS)), para avaliação da presença de leveduras de *H. capsulatum*. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (80% ao absoluto), lavados com xilol e cobertos com lamínulas para análise dos componentes celulares presentes.

3.18 Recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC) do pulmão de animais infectados e tratados com microesferas

Quatorze dias após a infecção, os animais foram sacrificados e seus pulmões pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo de 50 mL, contendo 15 mL da solução de digestão (Liberase 6µg/µL em RPMI 0,5 µg/mL) para cada amostra e, em seguida, incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos. A alíquota retirada após a digestão dos fragmentos de pulmão foi diluída 20 e 50 vezes em RPMI-I (diluição ótima obtida em experimentos anteriores para os ensaios com animais 129 e 5-LO^{-/-}, respectivamente), sendo 200 µL desta diluição distribuída em placas de cultura contendo meio BHI-ágar-sangue. As placas foram mantidas a 37°C, durante 21 dias e após este período, as colônias de leveduras que cresceram nas placas foram contadas manualmente.

3.19 Quantificação de citocinas inflamatórias nos homogeneizados de pulmão dos animais infectados e tratados com microesferas

Os pulmões dos animais avaliados foram pesados, triturados e, após centrifugação, os sobrenadantes utilizados para o ensaio de ELISA. Foram quantificadas as citocinas IFN- γ , IL-12, TNF- α , (PharMingen). Para análise destas citocinas, as placas de 96 poços foram recobertas com a solução de ligação contendo o anticorpo de captura específico, diluído 1:1000 em tampão carbonato, e incubadas durante a noite, a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com PBS contendo 5% de soro bovino fetal, incubando-se por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas como descrito acima. Os padrões, utilizados na construção da curva, foram diluídos em tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20. Após a adição das amostras e dos padrões, as placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. A reação com o anticorpo de detecção foi realizada utilizando-se anticorpo de detecção anti-interleucina biotinilado (PharMingen) diluído 1:1000 em tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween 20. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagens, as placas foram incubadas por 30 minutos com StreptAB kit™ (Dako). Após as lavagens das placas, 100 μ L do substrato (TMB reagent set) foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 30 minutos, no escuro. A reação foi finalizada pela adição de 50 μ L de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 490 nm (uQuant, biotek Instruments Inc.) e as concentrações das citocinas foram determinadas a partir de uma curva padrão.

3.20 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o teste *t* de Student ou teste ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS

Determinação da morfologia e diâmetro das microesferas

Após a liofilização das microesferas obtidas pelo método de evaporação-extração do solvente, foi realizada a caracterização das mesmas, através da análise da distribuição de seus diâmetros médios, após a reconstituição em água bi-destilada. O método escolhido foi a difratometria a laser. Além disto, determinamos a forma e a topografia das microesferas obtidas, através de microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas formas esféricas, superfícies uniformes e diâmetros variando de 5 a 10 μm (Figuras 3 A, B e C). As microesferas contendo os mediadores encapsulados tiveram diâmetros semelhantes quando comparadas com as microesferas controle (sem a incorporação dos mesmos).

Figura 3. Fotomicrografias eletrônicas de varredura das microesferas controle (A), contendo LTB_4 (B) ou PGE_2 (C); 2,00 K; EHT 10,00 kV.

A Figura 4 mostra a distribuição dos diâmetros das partículas presentes na emulsão das microesferas de PLGA 50:50 avaliadas, as quais tiveram seus diâmetros analisados pelo feixe do laser, quando da dispersão deste ao colidir com as amostras. A Figura 4 A mostra que o diâmetro médio em 50% das microesferas de PLGA 50:50 (microesferas controle), em um volume de 100µL da suspensão foi de 4,970 µm. Já a Figura 4 B mostra que o diâmetro médio em 50% das microesferas contendo LTB₄ foi de 5,816 µm, nas mesmas condições estabelecidas para as microesferas controle, sem a incorporação do LTB₄. Neste caso, apenas 9,7% das partículas apresentaram diâmetros acima de 10 µm, enquanto que 32,7% das mesmas apresentaram diâmetros abaixo de 5 µm. Obtivemos resultado semelhante com as microesferas contendo PGE₂ (diâmetro médio de 5,7 µm), conforme mostra a Figura 4 C. Estes dados revelaram que 50% das micropartículas contendo LTB₄ ou PGE₂ obtidas através da nossa metodologia apresentaram o diâmetro adequado de 4 a 6 µm para administração intranasal ou intratraqueal em camundongos.

(A)

(B)

(C)

Figura 4. Distribuição dos diâmetros obtidos para as microesferas controle (A), contendo LTB_4 (B) ou PGE_2 (C). As amostras foram reconstituídas em 100 μ L de água para a análise. Diâmetros Médios (50% das partículas) obtidos = 4,97 μ m (A); 5,81 μ m (B) e 5,70 μ m (C).

Determinação das taxas de encapsulação dos mediadores e cinéticas de liberação *in vitro*

Com a finalidade de propor um método alternativo para a determinação da taxa de encapsulação de LTB₄ e PGE₂ nas microesferas, quantificamos estes mediadores nos sobrenadantes, empregando Ensaio Imunoenzimático (EIA) em microplaca de 96 poços. Este ensaio possui maior especificidade para os compostos analisados (LTB₄ e PGE₂), visto que se trata de uma reação de competição específica entre os anticorpos do Kit comercial e os mediadores presentes nos sobrenadantes.

Os gráficos abaixo representam as curvas de calibração obtidas nos ensaios:

Figura 5. Curva de calibração dos padrões de LTB₄ (6,2 a 800 pg/mL) obtida em 450 nm; $r^2 = 0,9980$.

Figura 6. Curva de calibração dos padrões de PGE₂ (50 a 6.400 pg/mL) obtida em 450 nm; $r^2 = 0,9918$.

Determinamos as concentrações de LTB₄ e PGE₂ presentes nas microesferas, através da inserção dos valores obtidos pelo método (%B/Bo, que significa a porcentagem de cada amostra analisada que se ligou aos anticorpos de captura, presentes no kit) nas equações:

$$y = -15,564 \ln(x) + 121,52 \text{ (para quantificação do LTB}_4\text{)}$$

$$y = -17,696 \ln(x) + 163,42 \text{ (para quantificação da PGE}_2\text{)}$$

Os valores obtidos nas quantificações foram de 500 ng/mL de LTB₄ em 3 mg de microesferas e 12,8 ng/mL de PGE₂ em 2 mg, previamente pesadas quando do início do processo de destruição das microesferas com os solventes empregados. No início do processo de microencapsulação, adicionamos 300 µL das soluções (10 µg/mL) de LTB₄ e (256 ng/mL) de PGE₂ (item 3.2) em 30 mg do polímero PLGA 50:50. Considerando-se 100% de encapsulação, teríamos em 3 mg de microesferas de LTB₄ o valor de 1 µg/mL, porém detectou-se 0,5 µg/mL, o que nos revelou o valor de 50% de encapsulação do LTB₄ presente nas microesferas. Aplicamos o mesmo cálculo para a determinação da taxa de encapsulação da PGE₂: em 2 mg de microesferas teríamos o valor teórico de 17 ng/mL. No entanto, detectou-se pelo método, a concentração de 12,8 ng/mL, o que nos revelou o valor de 75,7% de encapsulação da PGE₂.

Avaliamos também a cinética de liberação *in vitro* dos mediadores encapsulados, empregando célula de Franz (Figura 2). As Figuras 7 e 8 mostram as liberações acumulativas de LTB₄ e PGE₂, respectivamente, das microesferas de PLGA por difusão, durante 24 horas. Os valores foram representados como sendo a média ± D.P.

Figura 7. Liberação acumulativa *in vitro* de LTB₄ das microesferas de PLGA 50:50 em PBS/etanol (50:50), pH 7,4; (3 lotes).

Figura 8. Liberação acumulativa *in vitro* de PGE₂ das microesferas de PLGA 50:50 em PBS/etanol (50:50), pH 7,4; (3 lotes).

Com relação ao ensaio de liberação de LTB₄ das microesferas, nossos resultados revelaram um efeito “burst” de liberação de aproximadamente 45%, nas primeiras 5 horas de ensaio. Após este período, foi observado liberação constante do mediador do interior das microesferas, atingindo aproximadamente 75% da quantidade encapsulada. Já com relação à liberação *in vitro* da PGE₂ das microesferas, o efeito “burst” de liberação foi de

25%, nas primeiras 4 horas de ensaio. Após este período, foi observado liberação constante do mediador, atingindo aproximadamente 55% da quantidade encapsulada. A Figura 8 mostra que a PGE_2 tem um perfil de liberação mais lento, além de um efeito “burst” menos acentuado quando comparado com o ensaio de liberação das microesferas contendo LTB_4 .

Com relação ao tampão utilizado em nossos ensaios (PBS/etanol 50:50, pH 7,4), a adição de etanol teve a finalidade de otimizar a solubilidade dos mediadores no meio receptor, uma vez que estes são moléculas lipídicas. As análises da cinética de liberação dos mediadores liberados das microesferas foram realizadas aplicando-se o modelo matemático de Higuchi, o qual forneceu os valores inseridos nos gráficos:

Figura 9. Aplicação do modelo matemático de Higuchi no estudo de dissolução do LTB₄ das microesferas; $r^2 = 0,9582$.

Figura 10. Aplicação do modelo matemático de Higuchi no estudo de dissolução da PGE₂ das microesferas; $r^2 = 0,9585$.

Os estudos da cinética de liberação *in vitro* revelaram bons coeficientes lineares entre os pontos analisados e estão de acordo com o modelo de difusão dos mediadores através dos microporos existentes no polímero, conforme evidencia o modelo de Higuchi. Outros mecanismos de liberação dos

mediadores para o meio receptor também podem estar ocorrendo simultaneamente, porém não foram avaliados em nossos estudos.

Distribuição das microesferas de PLGA ao longo do trato respiratório

Com a finalidade de visualizar a fagocitose das partículas pelos macrófagos alveolares de camundongos 5-LO^{-/-}, coletados após as administrações intranasal das microesferas nos tempos: 4 horas; 1, 4, 7 e 10 dias, foram confeccionadas lâminas contendo estas células, coradas com corante panótico. A Figura 11 mostra diferentes quantidades de microesferas (esferas refringentes apontadas pelas setas) no interior dos macrófagos analisados.

Figura 11. Fotomicrografias ilustrativas de macrófagos alveolares de camundongos 5-LO^{-/-}, recuperados após as administrações intranasal de microesferas controle. Setas pretas mostram microesferas fagocitadas. Coloração panótica. Aumento 1000x.

Podemos observar que, até o 4º dia após a administração intranasal das microesferas controle, não há fagocitose nítida ou visualizada das partículas pelas células. Por outro lado, principalmente no 7º, mas também no 10º dia após as administrações, foi possível visualizar as esferas fagocitadas no interior dos macrófagos.

Estudo de estabilidade do LTB₄ encapsulado em microesferas

Tendo como objetivo avaliar a degradação da molécula de LTB₄ encapsulada em microesferas após meses e mediante exposição a diferentes temperaturas, foi realizado ensaio de estabilidade destas partículas por 5 meses, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A Figura 12 mostra os perfis de degradação da molécula de LTB₄ nas diferentes temperaturas.

Figura 12. Degradação do LTB₄ encapsulado em microesferas quando submetido a diferentes temperaturas durante meses.

O ensaio mostrou que quando armazenadas entre -80 e -20°C, as microesferas são capazes de proteger de maneira mais eficiente a molécula de LTB₄. Após 5 meses do início deste estudo de estabilidade, foram detectados 21,4% de perda em massa do mediador quando as partículas foram armazenadas a -80°C, seguidos de 33,2% a -20°C, 33,8% a 4°C, 41,3% a 20°C e 53% a 40°C.

Discussão

O método de microencapsulação proposto neste trabalho apresentou boa eficiência, uma vez que os volumes de LTB₄ e PGE₂ adicionados na fase orgânica da emulsão, no momento da solubilização com o polímero, tiveram boa taxa de incorporação na matriz polimérica e não provocaram aumento excessivo do diâmetro das microesferas nem perdas excessivas dos compostos encapsulados.

O pequeno aumento de 0,846 µm no diâmetro médio detectado nas microesferas contendo os mediadores, quando comparado com as microesferas controle, pode ser explicado pelo aumento de volume dos poros da matriz polimérica, devido à incorporação das soluções de LTB₄ ou PGE₂ (volume de 300 µL) na fase orgânica da emulsão. Com relação à análise das microesferas através da microscopia eletrônica de varredura, tanto a forma como a topografia das partículas obtidas foram satisfatórias, evidenciando superfícies lisas e homogêneas (Figuras 3 A, B e C). Esta característica apresentada pelas partículas foi de grande importância para nossos ensaios envolvendo a administração intranasal das mesmas em camundongos, visto que, apesar do polímero PLGA possuir certo grau de mucoadesividade, sua boa aerodinâmica com forma esférica e lisa, além do residual de carga negativa (MANCA et al., 2008), constituíram características físicas importantes capazes de minimizar possíveis interações entre as partículas e a mucosa nasal. Tal fato favoreceu a entrega ou deposição das mesmas nos pulmões, percorrendo todo o trato respiratório, desde a instilação nasal até o interior dos macrófagos alveolares, conforme demonstrado pelo ensaio de distribuição das partículas (Figura 11). Pudemos observar, através de microscopia óptica, esferas refringentes no interior dos macrófagos alveolares, especialmente no 7° e 10° dias após as administrações.

Nossos resultados envolvendo os perfis de liberação dos mediadores das microesferas mostraram diferentes comportamentos entre as formulações avaliadas. Com relação à metodologia escolhida para a análise destes perfis, alguns trabalhos têm mostrado estudos de liberação *in vitro* de nanopartículas sólido-lipídicas ou poliméricas, utilizando célula de difusão vertical de Franz ou

bolsas de diálise (GEZE et al., 1999; CHEN et al., 2001). As membranas de diálise utilizadas nestes ensaios permitem a deposição das partículas em áreas restritas e favorecem a liberação imediata da amostra avaliada para o meio receptor. Em nossos ensaios, enquanto a cinética de liberação *in vitro* do LTB₄ (Figura 7) mostrou um efeito burst de liberação acentuado (45%), o perfil de liberação da PGE₂ das partículas mostrou-se mais lento durante todo o período avaliado (24h), evidenciando a maior retenção da molécula deste mediador no polímero. Tal fato pode ser explicado pela maior hidrofobicidade da molécula de PGE₂ quando comparada com a de LTB₄ e consequente afinidade pela fase orgânica no interior das partículas. Em nossos estudos não foi observado 100% de liberação dos mediadores encapsulados, pois tal condição exige a degradação total das partículas poliméricas e nosso ensaio não contemplou um período longo de liberação (semanas a meses).

Com relação aos resultados obtidos no estudo de estabilidade da molécula de LTB₄, avaliada durante meses, observamos que quando as microesferas foram armazenadas entre -80 e -20 °C (condição geralmente adotada antes do início de cada ensaio) ocorreram perdas de somente 20 a 30% da massa do mediador após 5 meses do estudo. Porém, uma crescente degradação do mesmo ocorre à medida que a temperatura se eleva, ratificando a labilidade da molécula de LTB₄ (BUREAU et al., 1997) e/ou sugerindo uma possível perda de conformação nos arranjos entre as cadeias do polímero, facilitando a exposição da molécula de LTB₄ ao ambiente externo. Neste sentido, quando as microesferas foram expostas à temperatura de 40°C, próxima da temperatura de Transição Vítreia (Tg) do PLGA (acima de 37°C), houve maior perda da quantidade de LTB₄ inicialmente encapsulada, reforçando a idéia de que possíveis alterações na forma ou cristalinidade do polímero influenciaram na degradação do mediador. Desta forma, além do sistema microparticulado proposto constituir um sistema de liberação dos mediadores, também se mostrou capaz de proteger a molécula do LTB₄, encapsulado durante meses.

Diante destes achados, os estudos de liberação *in vitro* dos mediadores nos revelaram resultados interessantes e nos permitem sugerir que estas substâncias também são liberadas *in vivo*, próximas ao órgão-alvo em situação de terapia. Uma vez que obtivemos uma formulação adequada quanto à

composição polimérica adequada para o organismo, ao diâmetro e morfologia das partículas e à sustentação da liberação por horas e dias, pudemos focar nossos estudos na ação do LTB₄ e da PGE₂ no ambiente pulmonar, em animais infectados pelo *H. capsulatum*.

**PARTE II: AVALIAÇÃO DA PRESERVAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DOS MEDIADORES MICROENCAPSULADOS**

Avaliação *in vitro* da preservação da atividade biológica do LTB₄ liberado das microesferas

A expressão de moléculas de adesão CD11b/CD18 (Mac-1) por macrófagos da linhagem celular J774, induzida pelas microesferas contendo LTB₄ ou pelas alíquotas provenientes dos ensaios de liberação *in vitro* foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos levando-se em consideração o aumento linear da intensidade de fluorescência das células marcadas, representado por valores de mediana, após 4h de incubação. As células foram incubadas com diferentes estímulos: solução de LTB₄ como controle positivo (LTB₄ 1 µg/mL); alíquotas provenientes da liberação do LTB₄ das microesferas nos tempos 0, 4 e 24 horas (lib 0, 4 e 24 horas); microesferas controle (Me controle); microesferas contendo LTB₄ (Me LTB₄). Como controle negativo foram utilizadas as células J774 incubadas em meio de cultura (cél + meio). A Figura 13 mostra um histograma representativo de cada grupo, do aumento da expressão de Mac-1 pelos macrófagos, após incubação com as microesferas.

Figura 13. Histogramas representativos (3 experimentos) da expressão de Mac-1 por células J774 incubadas 4h com os diferentes estímulos. M1 representa a região de expressão de Mac-1 pelas células. Análise de 10⁴ células.

Figura 14. Expressão da molécula de adesão Mac-1 em células J774 murinas incubadas 4h com (A) alíquotas de LTB₄ liberadas das microesferas e (B) microesferas. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (3 experimentos). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparados com grupo (células + meio). # $P < 0,05$, Me LTB₄ comparado com Me controle.

Os histogramas obtidos após análise dos resultados (Figura 13) revelam que todos os estímulos foram capazes de induzir aumento na expressão de Mac-1 pelas células (região M1), quando comparados com as células incubadas em meio de cultura (controle negativo). As microesferas contendo LTB₄, por sua vez, foram capazes de induzir aumento mais evidente (88%) na

expressão de Mac-1 quando comparado com aquele detectado pelo controle negativo (72%).

A Figura 14 A mostra que as alíquotas provenientes do ensaio de liberação *in vitro* (lib 0, 4 e 24 horas), nas quais foram detectadas concentrações de LTB₄ de 30, 60 e 40 ng/mL, respectivamente, foram capazes de induzir aumentos significativos na expressão de Mac-1 pelos macrófagos quando comparadas com as células J774 em meio de cultura (céls + meio). Porém, quando comparadas entre si, estas alíquotas não revelaram aumentos significativos na intensidade de fluorescência detectada. Já a Figura 14 B mostra que tanto as microesferas controle quanto as que continham LTB₄ (Me LTB₄) induziram aumentos significativos na expressão de Mac-1 pelas células, quando comparados com aqueles obtidos para as células incubadas em meio de cultura. No entanto, enquanto as Mes controle induziram aumento na expressão de Mac-1 semelhante à solução de LTB₄ (controle positivo), as Mes LTB₄ foram capazes de induzir aumento de intensidade de fluorescência superior ao dos outros estímulos, inclusive de maneira significativa quando comparado com as Mes controle.

Avaliação da fagocitose das microesferas por macrófagos peritoneais murinos

Microesferas controle ou contendo os mediadores LTB₄ ou PGE₂, utilizadas neste ensaio tiveram seus diâmetros caracterizados entre 5 e 6 µm, conforme descrito anteriormente (Figura 4). Quando incubadas com macrófagos peritoneais de camundongos, o número de microesferas de LTB₄ fagocitadas pelas células foi muito maior do que o de microesferas controle (Tabela 1). Um ensaio de inibição da fagocitose realizado a 4°C mostrou que nenhuma partícula foi fagocitada nesta temperatura. As Figuras 15 A e B ilustram, respectivamente, microesferas controle e contendo LTB₄ fagocitadas pelos macrófagos a 37°C, após 2h de incubação. A morfologia celular visualizada, resultante da fagocitose das microesferas que continham o mediador foi diferente daquela observado quando estas células fagocitaram as microesferas controle (sem a incorporação do mediador). A Figura 15 B mostra células com delimitações irregulares de membranas e projeções citoplasmáticas típicas de células em processos de fagocitose.

Figura 15. Macrófagos peritoneais murinos que fagocitaram microesferas controle (A), contendo LTB₄ (B) ou PGE₂ (C). Células identificadas por coloração panótica e visualizadas por microscopia de campo claro. Aumento de 1000x. As setas pretas mostram microesferas fagocitadas.

Tabela 1 – Macrófagos peritoneais murinos incubados com microesferas contendo LTB₄ fagocitam maior número de partículas

Amostras	% de macrófagos contendo Mes	Número de Mes por célula
Microesferas controle	96 ± 1,4	3,7 ± 2,3
Microesferas contendo LTB ₄	97 ± 1,4	*13,3 ± 6,3

As células foram incubadas por 2h com suspensão de 1mg/mL de Mes controle ou contendo LTB₄ ($7,8 \times 10^{-7}$ M), em meio RPMI completo. As células foram identificadas por coloração panótica e visualizadas em microscopia de campo claro, com aumento de 1000x. O resultado foi expresso como sendo Média ± EPM; (n = 3 experimentos); * $P < 0,05$.

Com relação às microesferas contendo PGE₂, observamos que o número destas fagocitadas pelos macrófagos foi semelhante ao de microesferas controle (Tabela 2). A Figura 15 C mostra as microesferas contendo PGE₂ que foram fagocitadas pelos macrófagos incubados a 37°C, por 2h, 5% CO₂. A morfologia celular visualizada, resultante da fagocitose das microesferas que continham o mediador foi semelhante àquela observada para as microesferas controle (Figura 15 A), não sendo evidenciada nenhuma projeção citoplasmática ou irregularidades na membrana celular, conforme observado no ensaio com as microesferas contendo LTB₄. No entanto, a porcentagem de macrófagos que fagocitaram as microesferas contendo PGE₂ foi significativamente menor quando comparado com os que fagocitaram microesferas controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Macrófagos peritoneais murinos incubados com microesferas contendo PGE₂ fagocitam menor número de partículas

Amostras	% de macrófagos contendo Mes	Número de Mes por célula
Microesferas controle	96 ± 1,4	3,7 ± 2,3
Microesferas contendo PGE ₂	***47 ± 0,5	2,6 ± 1,5

As células foram incubadas por 2h com suspensão de 1mg/mL de Mes controle ou contendo PGE₂ (2,0 x 10⁻⁸ M), em meio RPMI completo. As células foram identificadas por coloração panótica e visualizadas em microscopia de campo claro, com aumento de 1000x. O resultado foi expresso como sendo Média ± EPM; (n = 3 experimentos); *** *P* < 0,001.

PGE₂ liberada das microesferas diminui a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS

Sabendo da literatura que PGE₂ inibe a produção de TNF- α , fomos investigar o efeito deste mediador lipídico encapsulado em microesferas sobre a produção desta citocina por macrófagos estimulados com LPS. Para tanto, macrófagos peritoneais murinos foram incubados com as microesferas controle ou contendo o mediador, ou ainda, com soluções de PGE₂. Após o estímulo com LPS, as células foram incubadas por 4h e seus sobrenadantes reservados para quantificação da citocina por ELISA. A Figura 16 mostra as concentrações de TNF- α detectadas.

Figura 16. Efeito da PGE₂ liberada das microesferas sobre a produção de TNF-α por macrófagos. As células foram pré-incubadas (1h) com 2 mg das microesferas ou solução de PGE₂ e estimuladas com LPS (0,5 µg/mL). Após 2h, os sobrenadantes foram reservados para quantificação da citocina por ELISA. Resultados expressos como sendo Média ± EPM; (n = 3 experimentos). ** $P < 0,01$, comparado com grupo controle (meio). # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$, comparados com LPS.

A Figura 16 mostra que quando as células foram pré-incubadas com as diferentes amostras e estimuladas com LPS houve uma redução significativa na liberação da citocina, quando comparada com células apenas estimuladas com LPS. Além disso, tanto as soluções de PGE₂ quanto sua forma encapsulada foram capazes de reduzir a produção de TNF-α de maneira significativa quando comparada com as Mes controle. Diante disso, observamos que o mediador encapsulado e liberado das microesferas foi capaz de inibir a produção da citocina pelas células de forma similar àquela exercida pela solução de PGE₂ (3×10^{-7} M).

LTB₄ liberado das microesferas intracelularmente aumenta a produção de NO e a expressão de PPAR- α em macrófagos peritoneais murinos Com o objetivo de investigar o efeito do LTB₄ liberado das microesferas sobre a produção de NO e expressão do receptor nuclear PPAR- α por macrófagos peritoneais murinos, incubamos estas células com diferentes estímulos avaliados. A Figura 17 mostra resultados interessantes com relação à preservação da atividade biológica do LTB₄ encapsulado, bem como à ativação celular conferida pelas microesferas.

Figura 17. Produção de NO (A) e expressão de PPAR- α (B) por macrófagos peritoneais murinos após 4h de incubação em meio RPMI. As células foram incubadas com solução de LTB₄ (5×10^{-8} M) na presença ou ausência do antagonista do receptor BLT1, CP 105,696. Semelhantemente, as células foram incubadas com as microesferas controle ou contendo LTB₄ (1 mg/mL). (A) Concentrações de nitritos nos sobrenadantes foram quantificadas pela reação de Griess. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, comparados com o controle negativo (Meio). ### $P < 0,01$, Mes_LTB₄ + CP comparadas com Mes_LTB₄; ($n = 3$ experimentos). (B) Análise por *Western blot* para PPAR- α . As medidas densitométricas mostram resultados representativos de 3 experimentos independentes (Média $\pm$ EPM). ** $P < 0.01$, Mes_LTB₄ + CP comparadas com solução de LTB₄ + CP. ### $P < 0.01$, Mes_LTB₄ + CP comparadas com Mes_LTB₄.

Os resultados obtidos mostram que elevados níveis de nitritos, como medida indireta da produção de NO pelas células, foram detectados apenas após estímulo das mesmas com as Mes LTB₄, tanto na presença quanto ausência do antagonista específico do receptor BLT1, CP 105,696 (Figura 17 A). No entanto, quando as células foram pré-tratadas com o antagonista e incubadas com as Mes LTB₄, foi detectado aumento significativo dos níveis de nitritos, quando comparado com as células estimuladas na ausência do CP 105,696. A partir deste dado fomos investigar o efeito da liberação e interação do LTB₄ encapsulado exclusivamente no ambiente intracelular sobre a ativação dos macrófagos. Para tanto, escolhemos como parâmetro a análise da expressão de receptores nucleares PPAR- α , os quais são ativados após a

liberação intracelular do LTB₄. A análise por *Western blot* (Figura 17 B) mostra que o tratamento das células com solução de LTB₄ aumentou a expressão do receptor nuclear PPAR- α , porém este efeito foi inibido pela adição do antagonista do receptor de membrana BLT1. Por outro lado, quando as células foram tratadas com as Mes LTB₄, detectou-se aumento na expressão do receptor. Interessantemente, o aumento mais evidente na expressão do receptor foi detectado quando foi adicionado previamente ao meio de incubação o antagonista CP 105,696, especialmente quando comparamos este aumento com aquele observado para os tratamentos com a solução de LTB₄ e Mes LTB₄ na ausência deste antagonista.

Avaliação da migração celular para o lavado broncoalveolar de camundongos 5-LO^{-/-} que receberam microesferas controle ou contendo LTB₄

A administração i.t. das microesferas controle ou contendo LTB₄ induziram recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar, quando comparado com animais que receberam apenas PBS (veículo). O número de células mononucleares recuperadas do LBA dos animais que receberam as microesferas contendo LTB₄ foi significativamente maior que aquele com PBS, nos dias 4 e 7 após as administrações (Figura 18 A). A administração de microesferas controle nos animais também foi capaz de induzir o recrutamento de células mononucleares, quando comparada com os que receberam PBS, porém em menor número quando comparada com os animais que receberam microesferas contendo LTB₄ ou o mediador em solução (grupos Mes_LTB₄ e LTB₄ (3×10^{-8} M), respectivamente), exceto no primeiro dia após a administração. LTB₄ em solução recrutou elevado número de células quando comparado com PBS, especialmente no 4º dia após a administração. Depois deste período, o número de células recrutadas diminuiu, atingindo valores semelhantes ao grupo PBS. Por outro lado, o número de neutrófilos recrutados para o espaço broncoalveolar, no 7º dia após a administração, mediante a ação do LTB₄ liberado do interior das microesferas, foi maior que aquele induzido pelas microesferas controle (Figura 18 B). Os animais que receberam Mes_controle e LTB₄ em solução não apresentaram aumento do número de neutrófilos durante o período de tempo avaliado.

Figura 18. Número de células mononucleares (A) e neutrófilos (B) recuperados do LBA de camundongos 5-LO^{-/-} após administração i.t. de PBS, solução de LTB₄ (3 × 10⁻⁸ M), microesferas controle ou contendo LTB₄. Células do LBA foram obtidas dos animais nos dias 1, 4, 7 e 10 após as administrações. Células também foram obtidas de animais que não foram submetidos aos tratamentos ("naïve") (A). As células foram identificadas por coloração panótica. Resultados expressos como sendo Média ± EPM; (n = 4 animais). *P < 0,05; **P < 0,01 e ***P < 0,001, comparados com o grupo PBS. #P < 0,05 e ##P < 0,01, Mes_LTB₄ comparadas com Mes_controle.

Figura 19. Cortes histológicos representativos do pulmão de camundongos 5-LO^{-/-} que receberam (A) PBS; (B) LTB₄ em solução; (C) Microesferas controle; (D) Microesferas contendo LTB₄. Os pulmões (5 animais por grupo) foram removidos 7 dias após as administrações, fixados e inseridos em parafina. Coloração HE. Aumentos de 50 e 400x.

Os cortes histológicos dos pulmões removidos 7 dias após a administração dos diferentes estímulos mostra que os animais que receberam as Mes_LTB₄ (Figura 19 D) tiveram um infiltrado de leucócitos no parênquima pulmonar mais intenso quando comparado com os demais grupos. Porém, os animais que receberam Mes_controle (Figura 19 C) também apresentaram aumento de infiltrado celular no parênquima. Estes resultados ratificam os perfis de migração de células mononucleares (Figura 18 A) e neutrófilos (Figura 18 B) para o LBA dos animais, induzidos pelos diferentes estímulos avaliados.

Efeito da administração de microesferas contendo LTB₄ sobre as interações leucócitos-células endoteliais

A Figura 20 mostra os parâmetros das respostas leucocitárias induzidas pelas administrações de solução fisiológica estéril (salina), LPS (0,05 µg/Kg), microesferas de PLGA controle (mes_controle) ou contendo LTB₄ (mes_LTB₄), bem como LTB₄ em solução (sol LTB₄) na microcirculação cremastérica de camundongos.

Figura 20. Efeito da administração de LTB₄ em solução ou encapsulado em microesferas de PLGA sobre as respostas leucocitárias: fluxo de leucócitos em fase de rolamento (A), velocidade de leucócitos em fase de rolamento (B), adesão (C) e emigração (D) em vênulas pós-capilares do músculo cremaster de camundongos. Os valores foram obtidos 4h após administração intraescrotal de solução fisiológica, solução LPS (0,05 μg/Kg), microesferas de PLGA controle ou contendo LTB₄ (1 mg/mL) ou solução de LTB₄ (0,2 μg/mL). Resultados expressos como Média ± EPM; (2 experimentos). **P* < 0,05; ***P* < 0,01; *** *P* < 0,001, comparados com o grupo salina. #*P* < 0,05 e ##*P* < 0,01, Mes_LTB₄ comparado com Mes_control.

A microscopia intravital foi utilizada para avaliar as interações entre os leucócitos e as células endoteliais na microcirculação cremastérica. A Figura 20 ilustra o efeito dos diferentes estímulos sobre a indução das respostas leucocitárias avaliadas. Após 4h da injeção intraescrotal de LPS (100 μ L/testículo, 0,05 μ g/kg), foi observado aumento significativo no fluxo de leucócitos em fase de rolamento ($91,0 \pm 7,8$ vs. $46,0 \pm 1,7$ céls/min), na adesão ($14,0 \pm 2,8$ vs. $1,0 \pm 1,4$ céls por 100 μ m vaso) e na emigração leucocitária ($20,5 \pm 0,7$ vs. $1,3 \pm 1,0$ céls por campo), seguida pela diminuição significativa na velocidade dos leucócitos em fase de rolamento ($8,4 \pm 1,9$ vs. $25,9 \pm 3,3$ μ m/s), quando comparados com os valores observados após injeção de salina (grupo controle). Além disto, a injeção das mes_LTB₄ aumentou, significativamente, o fluxo de leucócitos em fase de rolamento ($72,0 \pm 5,2$ vs. $46,0 \pm 1,7$ céls/min), adesão ($4,0 \pm 1,0$ vs. $1,2 \pm 0,5$ céls por 100 μ m vaso) e emigração leucocitária ($7,3 \pm 0,6$ vs. $1,3 \pm 1,0$ céls por campo), seguida pela diminuição da velocidade dos leucócitos em fase de rolamento ($14,1 \pm 0,9$ vs. $25,9 \pm 3,3$ μ m/s), quando comparados com os valores obtidos após injeção de salina. Vale ressaltar que os animais que receberam tanto as mes_controle quanto LTB₄ em solução também apresentaram respostas leucocitárias após estas injeções, porém características de estímulos pouco inflamatórios. Nenhum estímulo empregado teve efeito significativo em alterar a resultante das forças exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a parede dos vasos ("shear rate") (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros hemodinâmicos da microcirculação cremastérica murina após injeção dos diferentes estímulos

	Salina	LPS	Mes_controle	Mes_LTB ₄	Sol. LTB ₄
Diâmetro Venular (μm)	$26,5 \pm 4,7$	$28,0 \pm 3,4$	$19,5 \pm 1,5$	$17,3 \pm 1,2$	$20,0 \pm 2,0$
“Shear rate” Venular (s^{-1})	$618,7 \pm 6,2$	$784,0 \pm 1,3$	$843,8 \pm 108,5$	$670,2 \pm 65,0$	$879,0 \pm 143,7$

Valores (Média $\pm$ EPM) obtidos 4h após injeção intraescrotal de salina, LPS (0,05 $\mu\text{g/kg}$), mes controle ou contendo LTB₄ (1 mg/mL) e solução de LTB₄ (0,2 $\mu\text{g/mL}$); ($n = 4$). Resultados obtidos de 2 experimentos diferentes.

As fotomicrografias obtidas da microcirculação cremastérica, após injeção dos estímulos, mostram diferentes quantidades de leucócitos nas vênulas pós-capilares, bem como aqueles emigrados para o tecido (Figura 21).

Figura 21. Leucócitos em microcirculação e aderidos/emigrados (setas pretas) após 4h da administração de (A) e (B) solução fisiológica estéril; (C) e (D) LPS (0,05 $\mu\text{g/kg}$); (E) microesferas controle; (F) e (G) microesferas contendo LTB_4 (1 mg/mL); (H) e (I) LTB_4 em solução (0,2 $\mu\text{g/mL}$). Aumentos em A, C, E, F, G, H e I (1.300x) e em B e D (3.250x). A distância entre os dois círculos escuros das figuras equivale a 100 μm , e foi utilizada para os cálculos dos parâmetros avaliados.

Microesferas contendo LTB₄ induzem produção de nitritos por HUVECs e HUAECs

As Figuras 22 e 23 mostram que tanto as HUVECs quanto as HUAECs foram capazes de produzir nitritos quando incubadas com as microesferas contendo LTB₄. A produção de nitritos pelas células endoteliais foi quantificada conforme descrito em “Material e Métodos”. Nos ensaios com HUVECs, todos os estímulos utilizados induziram aumento nos níveis de nitritos quando comparados com as células incubadas somente em meio de cultura (Figura 22). Tanto LTB₄ em solução quanto aquele liberado das microesferas foram capazes de induzir significativamente a produção de NO pelas células, quando comparados com as mes_controle. Estas, por sua vez, induziram baixos níveis de NO₂⁻. Já nos ensaios com HUAECs (Figura 23), apenas as microesferas contendo o mediador induziram aumento da produção de nitritos quando comparadas com o meio (controle), após 4 e 24h de incubação.

Figura 22. Concentrações de NO₂⁻ no sobrenadante de HUVECs após 4h de incubação em meio EBM-2. Nitritos foram quantificados por reação de Griess após incubação das células com suspensão de microesferas controle ou contendo LTB₄ (1 mg/mL) ou LTB₄ em solução (0,2 µg/mL). Resultados expressos como sendo Média ± EPM; (*n* = 2 experimentos). **P* < 0,05, ****P* < 0,001, comparados com meio (controle). ###*P* < 0,001, mes_controle comparado com mes_LTB₄.

Figura 23. Concentrações de NO_2^- no sobrenadante de HUAECs após (A) 4h e (B) 24h de incubação em meio EBM-2. Nitritos foram quantificados por reação de Griess após incubação das células com suspensão de microesferas controle ou contendo LTB₄ (1 mg/mL) ou LTB₄ em solução (0,2 $\mu\text{g/mL}$). Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; ($n = 2$ experimentos). *** $P < 0,001$, comparados com meio (controle). ### $P < 0,001$, mes_controle comparado com mes_LTB₄.

Microesferas contendo PGE_2 induzem produção de nitritos por HUVECs, mas não por HUAECs

A produção de nitritos pelas HUVECs foi quantificada conforme descrito. Todos os estímulos utilizados induziram aumento dos níveis de nitritos quando comparados com as células incubadas com meio de cultura (Figura 24). Tanto PGE_2 em solução quanto aquela liberada das microesferas induziram significativamente a produção de NO pelas células avaliadas. Além disto, a produção de nitritos induzida pelas mes_ PGE_2 foi significativamente mais elevada do que a induzida pelas mes_controle. Foram realizados também ensaios com HUAECs, porém estas produziram baixas quantidades de nitritos quando estimuladas com os diferentes estímulos (resultados não mostrados).

Figura 24. Concentrações de NO₂⁻ no sobrenadante de HUVECs após 4h de incubação em meio EBM-2. Nitritos foram quantificados por reação de Griess após incubação das células com suspensão de microesferas controle ou contendo PGE₂ (1 mg/mL) ou PGE₂ em solução (5 µg/mL). Resultados expressos como sendo Média ± EPM; (*n* = 2 experimentos). **P* < 0,05, ****P* < 0,001, comparados com meio (controle). #*P* < 0,05, mes_controle comparado com mes_PGE₂.

Microesferas contendo LTB₄ induzem liberação da quimiocina MCP-1 no sobrenadante de HUVECs e HUAECs

Nosso próximo passo foi investigar se o LTB₄ liberado das microesferas induz a liberação de quimiocinas por células endoteliais humanas em cultura (HUVECs e HUAECs). A quantidade de quimiocina no sobrenadante celular foi detectada por ELISA. Nos ensaios com HUVECs, após 4h de incubação, as mes_LTB₄ induziram a liberação de quantidades elevadas da quimiocina MCP-1 quando comparadas com as células em meio de cultura (controle) (Figura 25 A). Por outro lado, tanto as mes_controle quanto LTB₄ em solução não induziram a liberação da quimiciona pelas células. Já nos ensaios com HUAECs, após 4h de incubação, todas as amostras induziram a liberação de MCP-1, quando comparadas com o grupo meio (controle) (Figura 25 B). Os resultados obtidos com as HUAECs sugerem que estas são estimuladas de

forma menos intensa pelos estímulos e produzem quantidades de MCP-1 muito baixas comparadas com as detectadas em HUVECs.

Figura 25. Concentrações de MCP-1 em sobrenadante de (A) HUVECs e (B) HUAECs após 4h de incubação em meio EBM-2. Foi adicionado a cada poço suspensão de microesferas controle ou contendo LTB₄ (1 mg/mL) ou LTB₄ em solução (0,2 µg/mL). MCP-1 foi detectado por ELISA. Resultados expressos como sendo Média ± EPM; ($n = 2$ experimentos). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparados com o meio (controle). ### $P < 0,001$, mes_controle comparado com mes_LTB₄.

Microesferas contendo PGE₂ induzem liberação da quimiocina MCP-1 no sobrenadante de HUVECs, mas não de HUAECs

Nosso próximo passo foi investigar se a PGE₂ liberada das microesferas foi capaz de induzir a liberação de MCP-1 por HUVECs e HUAECs em cultura. A quantidade de quimiocina no sobrenadante celular foi detectada por ELISA. Nos ensaios com HUVECs, após 4h de incubação, as mes_PGE₂ induziram a liberação de quantidades elevadas de MCP-1, quando comparadas com as células em meio de cultura (controle) (Figura 26). Por outro lado, tanto as mes_controle quanto PGE₂ em solução não foram capazes de induzir a liberação da quimiocina pelas células. Foram realizados também ensaios com HUAECs, porém estas apresentaram pouca produção de MCP-1 quando estimuladas com os diferentes estímulos (resultados não mostrados).

Figura 26. Concentrações de MCP-1 no sobrenadante de HUVECS após 4h de incubação em meio EBM-2. Foi adicionado a cada poço suspensão de microesferas controle ou contendo PGE₂ (1 mg/mL) ou PGE₂ em solução (5 µg/mL). MCP-1 foi detectado por ELISA. Resultados expressos como sendo Média ± EPM; ($n = 2$ experimentos). *** $P < 0,001$, comparados com o meio (controle). ### $P < 0,001$, mes_controle comparado com mes_PGE₂.

Discussão

De posse dos resultados obtidos em nossos estudos de caracterização *in vitro* das microesferas, fomos investigar em diversos modelos celulares a preservação da atividade biológica dos mediadores encapsulados, bem como os mecanismos pelos quais as microesferas podem ativar as células após o contato com as mesmas. Primeiramente, os resultados obtidos quando macrófagos da linhagem J774 foram incubados com as alíquotas provenientes do ensaio de liberação *in vitro* ou com as microesferas contendo LTB₄ demonstram que, apesar destas serem capazes de aumentar significativamente a expressão de Mac-1 nas células, as microesferas controle também exerceram este efeito. Tal fato pode ser explicado pelo menor diâmetro obtido quando da obtenção destas partículas (4,9 µm), quando comparado com o obtido nas preparações das microesferas contendo LTB₄ (5,8 µm), já que a fagocitose das partículas pelas células avaliadas deve ser considerada e este fenômeno pode estar relacionado com o ligeiro aumento na expressão de moléculas de adesão detectado. Alguns trabalhos mostram que a fagocitose de partículas é influenciada pelo tamanho das mesmas, bem como pelas propriedades de superfície das mesmas (TABATA & IKADA, 1991; RUDT & MÜLLER, 1992; MÜLLER et al., 1997; EVORA et al., 1998). Neste contexto, outros autores demonstraram que partículas com diâmetros intermediários, como as produzidas em nosso estudo, são capazes de exercer melhor contato com a membrana celular (interação das partículas com os “ruffles” de membrana), favorecendo sua internalização pela célula (CHAMPION et al., 2008). Vale ressaltar ainda, que em nossos estudos, a viabilidade celular após o contato com as partículas não foi comprometida (dados não mostrados). Vários trabalhos mostram estudos sólidos de biocompatibilidade e segurança envolvendo polímeros e microesferas de PLA/PLGA (MORIN et al., 1993; LACASSE et al., 1998), os quais corroboram, em nossos estudos, os resultados obtidos com a análise das microesferas poliméricas incubadas com os macrófagos.

Nossos resultados revelaram ainda que tanto as microesferas contendo LTB₄ quanto as alíquotas provenientes dos ensaios de liberação das mesmas

exerceram suas atividades biológicas sobre os macrófagos da linhagem estudada, sugerindo a manutenção da integridade da molécula de LTB₄ durante o processo de encapsulação e armazenamento. Além disto, foram observados aumentos significativos da intensidade de fluorescência quando comparamos o grupo Mes_LTB₄ com Mes_controle.

Buscando avaliar o efeito da liberação do LTB₄ das microesferas para o meio externo, foram realizados ensaios de fagocitose das partículas, utilizando macrófagos peritoneais murinos. Estudos envolvendo a fagocitose de micropartículas constituídas de PLGA por macrófagos peritoneais de rato demonstraram que, após interagirem com a membrana das células, as partículas são prontamente internalizadas, de maneira tempo-dependente (máximo de partículas internalizadas com 2h de incubação) (GOMES et al., 2006). Os resultados obtidos em nossos ensaios sugerem que durante o tempo de incubação das células com as microesferas contendo LTB₄, o mediador liberado para o meio externo favoreceu a ativação dos macrófagos, tornando-os mais ávidos ou competentes para a fagocitose. Outro fato importante a ser considerado é que as microesferas fagocitadas podem ter liberado gradativamente o mediador dentro da célula, sem interação prévia com o receptor de membrana específico para LTB₄ (BLT1). Estes dados nos forneceram subsídios para estudar diferentes mecanismos pelos quais as microesferas, contendo este mediador, podem regular o processo de ativação e/ou fagocitose pelos macrófagos. Dentre estes mecanismos, escolhemos avaliar o efeito das microesferas contendo LTB₄ sobre a produção de NO e expressão de receptor nuclear PPAR- α por macrófagos peritoneais murinos. Nossos resultados mostraram primeiramente, que quando estas células são incubadas com as microesferas contendo o mediador há aumento significativo nos níveis de nitritos detectados e este aumento é ainda mais evidente quando os macrófagos são previamente tratados com antagonista específico do receptor de membrana BLT1, CP 105,696. Este achado, além de nos intrigar, nos impulsionou a uma nova investigação, visto que havia indícios de que as microesferas poderiam ativar os macrófagos por mecanismos diferentes daqueles classicamente descritos, em que ocorre interação do LTB₄ com seu receptor de membrana BLT1 (YOKOMIZO et al., 1997). Devchand et al., (1996) descreveram, pela primeira vez, que a via PPAR- α - LTB₄ está envolvida

no controle da inflamação. Estes mesmos autores demonstraram que a molécula de LTB₄ é um ligante natural para o receptor nuclear PPAR- α . Tendo em vista este cenário, fomos avaliar se as microesferas contendo LTB₄ eram capazes de, uma vez fagocitadas pelos macrófagos, aumentar a expressão do receptor nuclear. Os resultados obtidos mostraram que bloqueando a interação prévia do mediador liberado no meio de cultura com o receptor de membrana BLT1, utilizando o antagonista CP 105,696, houve aumento significativo da expressão de PPAR- α pelas células, evidenciando que o LTB₄ liberado das microesferas, que exerceu sua atividade biológica exclusivamente intracelular, foi capaz de conferir um perfil de ativação diferente daquele observado quando as células foram tratadas com o mediador em solução.

Com a finalidade de avaliar a preservação da atividade biológica da PGE₂ liberada das microesferas, bem como estudar seus efeitos sobre macrófagos peritoneais murinos, realizamos, primeiramente, um ensaio de fagocitose. Assim, pudemos observar que o mediador liberado das partículas não foi capaz de diminuir significativamente o número de microesferas por célula (Tabela 2), mas sim, o número de macrófagos que fagocitaram estas partículas (% de macrófagos contendo Mes, Tabela 2). Além disto, as microesferas contendo PGE₂ foram capazes de diminuir significativamente os níveis da citocina TNF- α produzidos pelos macrófagos estimulados com LPS. Nossos dados estão de acordo com outros estudos que demonstram a inibição de TNF- α pela ação da PGE₂ (KUNKEL et al., 1986), dentre outras citocinas inflamatórias. A partir de nossos achados envolvendo a inibição da fagocitose das partículas pelos macrófagos, bem como da produção de citocinas inflamatórias pelos mesmos, podemos sugerir que a formulação contendo este mediador apresenta efeitos imunossupressores importantes em situação de terapia nos processos inflamatórios ou infecciosos.

Com a finalidade de investigar o efeito biológico do LTB₄ encapsulado liberado no ambiente pulmonar de camundongos 5-LO^{-/-}, foi avaliada a recuperação de células inflamatórias no LBA destes animais. Este ensaio nos permitiu, através de uma medida indireta da presença do LTB₄ nos pulmões (recrutamento celular), avaliar a preservação da atividade biológica da molécula deste mediador, uma vez que os animais estudados não apresentam

síntese endógena de leucotrienos e toda a ação observada foi devida à administração exógena. Os resultados sugerem que o LTB₄ encapsulado foi liberado gradativamente para o espaço broncoalveolar, uma vez que nossos dados demonstram que a atividade biológica do mediador foi preservada durante o período do ensaio. Além disso, a formulação empregada foi capaz de conferir um perfil de liberação prolongada do mediador, pois foi recuperado elevado número de neutrófilos 7 dias após a administração das microesferas (Figura 18 B). Por sua vez, LTB₄ em solução não foi capaz de exercer este efeito tardio no recrutamento de neutrófilos, sugerindo que ocorre rápida metabolização da molécula no ambiente pulmonar. Estudos prévios demonstraram que injeções de LTB₄ em solução induzem recrutamento rápido, mas não duradouro de neutrófilos (BUREAU et al., 1997; LEVY et al., 2001) e eosinófilos (FACCIOLI et al., 1991). Estes dados foram confirmados pela análise dos cortes histológicos dos pulmões dos animais submetidos aos diferentes tratamentos (Figura 19). As fotomicrografias obtidas revelaram que os animais que receberam as Mes_LTB₄ (Figura 19 D) tiveram infiltrado de leucócitos no parênquima pulmonar mais intenso quando comparado com os demais grupos. Curiosamente, o grupo que recebeu as Mes_controle (Figura 19 C) também revelou evidente infiltrado celular no parênquima. Estudos envolvendo a administração subcutânea de microesferas de PLGA vazias em ratos também demonstraram este efeito inflamatório exercido pelas partículas (ZOLNIK et al., 2008).

Em nossos estudos, avaliamos também o efeito da administração das microesferas sobre as respostas leucocitárias, através de microscopia intravital. Neste ensaio, com relação à adesão de leucócitos, observamos que o LTB₄ liberado das microesferas foi capaz de exercer o estímulo inflamatório de forma mais intensa quando comparado com sua forma em solução. Tal fato pode ser explicado devido ao metabolismo tempo-dependente da molécula de LTB₄ em solução durante as 4h do ensaio, desde o início de sua administração até a visualização no microscópio. Além disto, grande parte da quantidade do mediador encapsulado é liberada até 5 horas, de acordo com nossos resultados prévios de cinética de liberação *in vitro* (Figura 7). As quantidades encapsuladas remanescentes são posteriormente liberadas de maneira prolongada, o que sugere a diferença encontrada nos valores de adesão entre

este grupo e o grupo que recebeu o mediador em solução. A diferença na contagem de leucócitos entre estes dois grupos também foi observada quando avaliamos a emigração leucocitária para o tecido (Figura 20 D), apesar destes valores absolutos terem sido maiores que os de adesão (Figura 20 C). Estes dados sugerem que tanto o mediador em solução quanto o encapsulado e liberado das microesferas foram capazes de induzir reação inflamatória, uma vez que foram administrados localmente (tecido escrotal) e desencadearam na microcirculação periférica todas as respostas leucocitárias observadas. Ainda neste contexto, a adesão leucocitária é um fenômeno que ocorre anteriormente à emigração e que depende mais da intensidade do estímulo inflamatório do que o estabelecimento inicial de uma “fase de rolamento” dos leucócitos (LINDBOM et al., 1992). Além disto, outros trabalhos demonstraram que óxido nítrico (NO) impede a adesão leucocitária (GABOURY et al., 1993) e LTB₄ induz a produção do mesmo em células endoteliais. Outros trabalhos mostram ainda que LTB₄ induz adesão leucocitária no endotélio em curto período de tempo (15 a 20 minutos) e de modo dose-dependente (CASILLAN et al., 2003; SCHAFER et al., 2005). Esta adesão requer a rápida translocação de P-selectina para a membrana celular e atuação das integrinas transmembranas (LARSON & SPRINGER, 1990). Estes dados corroboram nossos resultados obtidos de que a injeção local das microesferas contendo LTB₄ foi um estímulo inflamatório mais intenso e duradouro quando comparado com a injeção do mediador em solução.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que as moléculas de LTB₄ encapsuladas e liberadas das microesferas foram capazes de atuar como mediador inflamatório na microcirculação das vênulas dos pós-capilares. Tal fato corroborou, através de uma outra abordagem, a boa escolha do método de microencapsulação proposto, o qual foi capaz de preservar a atividade biológica do LTB₄ encapsulado e atuar como um sistema de ativação celular diferente daquele exercido pelo mediador em solução, permitindo uma liberação gradual deste mediador durante o período avaliado.

De posse destes resultados, fomos investigar o efeito das formulações contendo os mediadores lipídicos sobre células endoteliais humanas. Estudos envolvendo estas células têm demonstrado que LTB₄ promove geração de nitritos e nitratos em HUVECs (GABOURY et al., 1993) e em

polimorfonucleares (LARFARS et al., 1999), sendo que este efeito é intensificado após pré-tratamento das células com LPS, sugerindo que ocorre aumento funcional na expressão dos receptores BLT1 (QIU et al., 2006). Além disto, outros estudos demonstraram que LTB₄ induz quimiotaxia e proliferação celular de artérias coronárias humanas (BACK et al., 2005). Nosso estudo revelou que quando as células endoteliais humanas foram incubadas com as Mes_LTB₄ houve aumento significativamente mais intenso da produção de nitritos quando comparadas com as Mes_controle ou LTB₄ em solução. Nossos resultados reforçam a idéia de que as microesferas protegem a molécula de LTB₄ contra degradação pelo ambiente, uma vez que o mediador em solução não foi capaz de exercer o mesmo efeito sobre as células durante o tempo de incubação proposto. Além disto, as Mes_LTB₄, quando comparadas com o mediador em solução, foram mais eficientes em “quebrar” o estado quiescente de ativação em que se encontravam as células endoteliais. Qiu et al., (2006) demonstraram que LPS, TNF- α e LTB₄ são capazes de romper este estado de ativação basal das HUVECs e induzir a produção de mediadores inflamatórios.

Assim como foi observado para as microesferas contendo LTB₄, as quais foram capazes de induzir produção de nitritos pelas células endoteliais humanas, o mediador lipídico PGE₂ também exerceu este efeito. Além disto, as microesferas contendo PGE₂, assim como as que contêm LTB₄, também induziram a produção de níveis de nitritos mais elevados quando comparados com o mediador em solução, sugerindo que a formulação proposta foi capaz de proteger a molécula encapsulada durante o período avaliado.

Com o objetivo de avaliar a produção de quimiocinas pelas células endoteliais humanas, após a estimulação com as microesferas, foram quantificados os níveis da quimiocina MCP-1. Estudos envolvendo a produção desta por HUVECs têm demonstrado que estímulos inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e LTB₄ aumentam significativamente sua produção. Além disto, estas substâncias induzem aumento da expressão dos receptores BLT1 na superfície destas células (QIU et al., 2006). Utilizando as Mes_LTB₄ como estímulo para as células endoteliais, queríamos avaliar se as mesmas exerciam o efeito inflamatório observado nos estudos de microscopia intravital

também através do aumento da quimiocina MCP-1, importante para o recrutamento de monócitos do sangue para o tecido.

Nossos resultados mostraram que as Mes_LTB₄ aumentaram significativamente os níveis de MCP-1 detectados no sobrenadante das células endoteliais e que, talvez, as HUAECs tenham um estado de ativação menos quiescente ou mais sensível aos estímulos avaliados que as HUVECs, conforme observado na Figura 25 B, mesmo sendo detectados níveis muito baixos de MCP-1 (maior valor = 30 pM). Quando comparamos o efeito estimulatório exercido pelas Mes_LTB₄ com aquele observado para o LTB₄ em solução, podemos observar que, assim como para os níveis de nitritos detectados, os níveis de MCP-1 são significativamente mais elevados, após 4h de incubação. Tal fato corrobora a idéia de que a molécula de LTB₄ foi protegida contra possíveis degradações e, uma vez liberada para o meio externo, foi capaz de induzir a liberação de MCP-1 pelas células, o que não ocorreu com o LTB₄ na sua forma em solução.

Com relação aos resultados obtidos nos ensaios envolvendo as Mes_PGE₂, pudemos observar que o mediador foi capaz de induzir a liberação de MCP-1 pelas células endoteliais humanas. Tal fato traz à luz da discussão uma atividade biológica deste mediador pouco estudada que é sua ação quimiotática para determinados tipos celulares. Apesar de alguns estudos demonstrarem que PGE₂ é um mediador anti-inflamatório, uma vez que induz a dissociação das subunidades p65 e p50 do fator de transcrição NF-κB em modelo de artrite (GOMEZ et al., 2005), outros demonstram que este mediador é pró-inflamatório, pois aumenta a liberação da quimiocina MCP-1 de mastócitos (NAKAYAMA et al., 2006) e monócitos (PANZER & UGUCCIONI, 2004).

Como já foi descrito anteriormente, as células endoteliais possuem um estado de ativação quiescente e são necessários estímulos inflamatórios potentes para que as mesmas produzam citocinas, quimiocinas ou outros mediadores inflamatórios como a própria PGE₂. Caughey et al., (2001) demonstraram que a expressão dos receptores de COX-2 e consequente liberação de PGE₂ em células endoteliais são aumentadas quando as mesmas são estimuladas com IL-1β.

Nos experimentos com HUVECs, assim como nos outros descritos nesta parte dos resultados, nossa formulação foi capaz de garantir a atividade biológica dos mediadores encapsulados, proporcionando efeito muito mais intenso dos mesmos sobre as células endotéliais, quando comparados com aqueles em solução. Tal fato sugere que, além da proteção conferida à molécula encapsulada, as microesferas *per se* induzem a ativação dos diferentes tipos celulares avaliados de uma maneira diferente da convencional, uma vez que esta se dá pela interação dos mediadores em solução com seus respectivos receptores de membrana. Até o momento, nossos resultados sugerem que dependendo do mediador encapsulado e do tipo de resposta desejada, podemos modular a resposta imune, principalmente a inata. Neste contexto, a ativação celular adequada é um fenômeno importante para o estabelecimento de uma resposta mais eficiente e duradoura. Uma vez entendido estes mecanismos, nossos estudos ganham relevância com relação à percepção de uma nova estratégia terapêutica no combate a doenças infecciosas.

**PARTE III: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS
MICROESFERAS NO MODELO DE INFECÇÃO POR *H.*
*capsulatum***

Recrutamento celular para o lavado broncoalveolar de camundongos 129 infectados e tratados com microesferas

Com o objetivo de avaliar se o tratamento com as microesferas contendo LTB₄, conforme estabelecido em nossos protocolos, foi capaz de alterar o perfil de migração celular para o espaço broncoalveolar dos animais infectados i.t. com inóculo letal de *H. capsulatum*, analisamos tanto quanti como qualitativamente as células recuperadas (Figura 27). A Figura 27 A mostra o influxo de leucócitos (céls. totais) para o espaço broncoalveolar após 14 dias da infecção com o fungo. Tanto o grupo de animais apenas infectado quanto aquele que recebeu microesferas contendo o mediador apresentaram elevado número de leucócitos recuperados do LBA. Por outro lado e de maneira surpreendente, os animais que receberam as microesferas controle apresentaram uma redução significativa no número de células recuperadas, quando comparada com aqueles apenas infectados com o fungo. Ainda com relação a este grupo, as Figuras 27 B e C mostram que houve semelhança entre os números de células mononucleares e neutrófilos recrutados, respectivamente. Já com relação ao grupo de animais que recebeu as microesferas contendo LTB₄, pudemos observar significativo recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar, quando comparado com o grupo Mes controle (Figura 27 C). Animais que receberam PBS pelo mesmo procedimento cirúrgico e foram tratados intranasalmente com o mesmo veículo não apresentaram recrutamento celular importante (dados não mostrados).

Figura 27. Número de células totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) recuperados do LBA de camundongos 129 14 dias após infecção com *H. capsulatum*. Os animais (5 por grupo) receberam intranasalmente microesferas controle ou contendo LTB₄ 1, 4, 7 e 10 após a infecção. As células foram identificadas por coloração panótica. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (n = 2 experimentos). * $P < 0,05$, comparados com o grupo Infectado. # $P < 0,05$, Mes_LTB₄ comparado com Mes_controle.

Recrutamento celular para o lavado broncoalveolar de camundongos 5-LO^{-/-} infectados e tratados com microesferas

Após termos avaliado o perfil de recrutamento celular para o espaço broncoalveolar de camundongos 129 (tipo selvagem) infectados com o fungo, fomos investigar se este perfil se alterava quando camundongos que não possuem síntese endógena de leucotrienos (5-LO^{-/-}) foram tratados com as microesferas. A Figura 28 A mostra o que tanto o grupo que recebeu as microesferas controle quanto aquele que recebeu as mesmas contendo o mediador tiveram aumento significativo no número de células recuperadas, quando comparados com o grupo apenas infectado. Como já havíamos observado nos resultados anteriores, enquanto o grupo que recebeu as microesferas controle apresentou números semelhantes entre células mononucleares e neutrófilos (Figuras 28 B e C, respectivamente), o grupo que foi tratado com as Mes LTB₄ apresentou maior recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar (Figura 28 C). De maneira semelhante aos experimentos envolvendo camundongos 129, os animais que receberam PBS pelo mesmo procedimento cirúrgico e foram tratados intranasalmente com o mesmo veículo não apresentaram recrutamento celular importante (dados não mostrados).

Figura 28. Número de células totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) recuperados do LBA de camundongos 5-LO^{-/-} 14 dias após infecção com *H. capsulatum*. Os animais (5 por grupo) receberam intranasalmente microesferas controle ou contendo LTB₄ 1, 4, 7 e 10 após a infecção. As células foram identificadas por coloração panótica. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (n = 2 experimentos). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparados com o grupo Infectado.

Avaliação da sobrevivência dos animais infectados com *H. capsulatum* que receberam microesferas controle ou contendo LTB₄

Após a análise do recrutamento celular das duas linhagens de camundongos estudadas, fomos investigar se o tratamento dos mesmos com as microesferas modificou a sobrevivência durante o curso da infecção pelo fungo. A Figura 29 A mostra a sobrevivência de camundongos da linhagem 129 (selvagem) infectados e tratados intranasalmente com microesferas 1, 4, 7 e 10 dias após infecção com inóculo letal do fungo *H. capsulatum* (3×10^6 lev./animal). Os animais da linhagem 129 apenas infectados com o fungo (129 Infec) apresentaram 25% de mortalidade a partir do 11º dia da infecção, evoluindo para 75% do 13º dia até o fim do período avaliado. Por outro lado, apenas 16% dos animais tratados com as Mes LTB₄ morreram a partir do 11º dia da infecção. Porém, este número aumentou de 66% (13º dia) para 83% (30º dia) de mortalidade. Curiosamente, todos os animais que receberam as microesferas controle sobreviveram até o fim do período avaliado. Já com relação à sobrevivência dos animais 5-LO^{-/-} infectados (Figura 29 B), os animais apenas infectados (5-LO^{-/-} Infec) tiveram uma taxa de mortalidade de 17% a partir do 8º dia da infecção, evoluindo para 67% após 3 dias. Todos os animais deste grupo morreram até o 12º dia. Já os animais que receberam as microesferas controle apresentaram taxa de mortalidade de 20% a partir do 8º dia da infecção, evoluindo para 80% no 12º dia. Por outro lado, os animais tratados com as Mes LTB₄ começaram a morrer somente 3 dias após os demais grupos (42% de mortalidade). Todos os grupos morreram até o 14º dia da infecção. Avaliamos também, em outro conjunto de experimentos (dados não mostrados), a sobrevivência destes animais infectados com *H. capsulatum* quando tratados com as microesferas apenas no 7º ou no 14º dia após a infecção. Os resultados mostraram que enquanto os animais 129 tratados com as Mes LTB₄ tiveram apenas 50% de mortalidade do 12º dia da infecção até o fim do período avaliado, os animais 5-LO^{-/-} que receberam a mesma formulação não sobreviveram além do 10º dia da infecção.

Figura 29. Curva de sobrevivência de camundongos 129 (A) e 5-LO^{-/-} (B) infectados intratraquealmente com 3×10^6 leveduras de *Histoplasma capsulatum*. Animais (6 por grupo) receberam as microesferas controle ou contendo LTB₄ 1, 4, 7 e 10 dias após a infecção. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (n = 2 experimentos).

Quantificação de citocinas inflamatórias nos homogeneizados de pulmão dos camundongos 129 e 5-LO^{-/-} infectados e tratados com as microesferas

Com o objetivo de investigar a produção de citocinas inflamatórias pelas células dos pulmões dos animais infectados com o fungo e tratados com as microesferas, quantificamos os níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-12 produzidos (Figura 30). Com relação aos animais 129 apenas infectados, aumentos significativos nos níveis das três citocinas avaliadas foram detectados, quando comparados com os grupos PBS (controle negativo). Quando os animais 129 infectados foram tratados com as Mes controle, os níveis de TNF- α e IFN- γ aumentaram significativamente, quando comparados com o grupo apenas infectado (Figuras 30 A e B, respectivamente). Já os níveis de IL-12 (Figura 30 C) foram semelhantes aos do grupo infectado. Por outro lado, os animais desta mesma linhagem que foram tratados com as Mes LTB₄ foram capazes de induzir a produção de níveis significativamente elevados das citocinas, quando comparados com o grupo PBS, porém não induziram aumentos significativos quando comparados com o grupo apenas infectado. Com relação aos animais 5-LO^{-/-} infectados, foram detectados aumentos significativos nos níveis de todas as citocinas avaliadas, quando comparados com o grupo PBS. Animais 5-LO^{-/-} infectados que receberam Mes controle não foram capazes de induzir aumentos significativos nos níveis de TNF- α e IFN- γ , quando comparados com o grupo apenas infectado, porém apresentaram diminuição significativa nos níveis de IL-12 (Figura 30 C). Por outro lado, animais 5-LO^{-/-} infectados e tratados com Mes LTB₄ induziram aumentos significativos nos níveis de TNF- α e IFN- γ detectados, quando comparados com o grupo infectado, mas não nos níveis de IL-12. Além disto, este grupo apresentou níveis significativamente mais elevados das citocinas TNF- α e IL-12, quando comparados com o grupo que recebeu Mes controle.

Figura 30. Produção de citocinas em homogeneizado de pulmão de camundongos (5 por grupo) infectados com *H. capsulatum* e tratados com as microesferas. Concentrações de TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-12 (C) após 14 dias de infecção. Animais controle receberam 100 μ l i.t. de PBS estéril. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (n = 2 experimentos). * P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001, comparados com PBS. # P < 0,05, ## P < 0,01 e ### P < 0,001, comparados com o grupo infectado de cada linhagem. & P < 0,05 e && P < 0,01, Mes LTB₄ comparado com Mes controle.

Análise dos cortes histológicos dos pulmões dos animais 129 e 5-LO^{-/-} infectados e tratados com as microesferas

A histopatologia dos pulmões dos animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com as microesferas foi avaliada após 14 dias de infecção. Pudemos observar, neste período, que o parênquima pulmonar dos animais 129 infectados tratados ou não com as microesferas apresentou comprometimento estrutural determinado pela presença de infiltrado de células inflamatórias (mononucleares e neutrófilos), bem como lesões granulomatosas bem definidas, que com frequência, tornam-se confluentes (Figuras 31 A, C e E). O granuloma, neste período de progressão, tem predominância de células mononucleares, circunscrevendo leveduras no seu interior (Figura 31 C). Após 14 dias de infecção, através da coloração pela prata (GMS), observamos uma lesão granulomatosa compacta com a presença das leveduras no interior deste granuloma (Figuras 31 B, D e F). Por outro lado, a histopatologia dos parênquimas pulmonares dos animais 5-LO^{-/-} infectados apresentou diferenças evidentes quanto ao número de leveduras alojadas nos alvéolos pulmonares, quando comparados os grupos apenas infectados (Figura 32 B), infectado e tratado com as microesferas controle (Figura 32 D) e tratados com as microesferas contendo LTB₄ (Figura 32 F). Apesar dos 3 grupos de animais apresentarem intenso infiltrado de células inflamatórias, lesões granulomatosas e comprometimento estrutural da arquitetura pulmonar (Figuras 32 A, C e E), pudemos observar, através da coloração GMS que o grupo de animais que foi tratado com as Mes LTB₄ (Figura 32 F) apresentou uma redução evidente no número de leveduras presentes na área tecidual analisada, quando comparamos com os animais apenas infectados (Figura 32 B) e, especialmente, com os animais que receberam as Mes controle (Figura 32 D). Correlacionando os resultados das duas linhagens de camundongos estudadas, observamos que os animais 5-LO^{-/-} apresentaram aumentos evidentes tanto no número quanto na dispersão de leveduras, quando comparados com os animais 129.

Figura 31. Fotomicrografias de cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos 129 infectados com *H. capsulatum* (A e B), tratados com Mes controle (C e D) e tratados com Mes LTB₄ (E e F). A seta preta indica a formação de granuloma. Os pulmões foram removidos 14 dias após a infecção. (A), (C) e (E), coloração HE; aumentos 50 e 400x. (B), (D) e (F), coloração GMS; aumentos de 50 e 1000x.

Figura 32. Fotomicrografias de cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos 5-LO^{-/-} infectados com *H. capsulatum* (A e B), tratados com Mes controle (C e D) e tratados com Mes LTB₄ (E e F). A seta preta indica a formação de granuloma. Os pulmões foram removidos 14 dias após a infecção. (A), (C) e (E), coloração HE; aumentos 50 e 400x. (B), (D) e (F), coloração GMS; aumentos de 50 e 1000x.

Determinação das UFC recuperadas dos pulmões dos animais infectados e tratados com as microesferas

Os resultados obtidos da histopatologia dos pulmões dos animais estudados demonstraram, principalmente através da coloração pela prata (GMS), que houve um aumento evidente no número de leveduras e na dispersão destas pelo parênquima pulmonar dos animais 5-LO^{-/-} infectados com o fungo, quando comparados com os animais 129. Diante disto, nosso próximo passo foi investigar o efeito da administração das microesferas nestes animais sobre a multiplicação do fungo nos pulmões. Para tanto, 14 dias após a infecção, realizamos a recuperação de UFC a partir dos pulmões obtidos dos animais tratados ou não com as microesferas (Figura 33). Pudemos observar que para os animais 129 infectados não houve diferença significativa no número de UFC recuperadas entre os 3 grupos avaliados (apenas infectado, infectado e tratado com Mes controle ou com Mes LTB₄). Por outro lado, nos pulmões de animais 5-LO^{-/-} infectados, foram recuperadas em média 2 log₁₀ UFC a mais, quando comparamos com a recuperação nos animais 129 infectados. Além disto, os animais 5-LO^{-/-} infectados e tratados com Mes LTB₄ tiveram redução significativa no número de UFC recuperadas, quando comparada com os grupos apenas infectado e infectado tratado com Mes controle.

Figura 33. Efeito da administração das microesferas sobre a multiplicação do *H. capsulatum*. Unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas dos pulmões de animais infectados (5 por grupo) tratados ou não com Mes controle ou Mes LTB₄ 14 dias após a infecção. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (n = 2 experimentos). * $P < 0,05$, comparado com os animais 129 infectados. # $P < 0,05$, Mes LTB₄ comparado com Mes controle.

Recrutamento celular para o lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 infectados e tratados com microesferas

Com relação aos estudos envolvendo a administração de microesferas contendo PGE₂ em animais infectados com *H. capsulatum*, fomos investigar se as mesmas eram capazes de alterar ou modular o perfil de migração celular para o espaço broncoalveolar dos animais infectados com inóculo sub-letal (5×10^5 lev/animal). Analisamos quanti e qualitativamente as células recuperadas (Figura 34). A Figura 34 A mostra o influxo de leucócitos (cél. totais) para o espaço broncoalveolar 14 dias após a infecção com o fungo. Tanto os animais infectados tratados com Mes controle quanto aqueles tratados com Mes PGE₂ apresentaram redução no número de células recuperadas, quando comparados com o grupo apenas infectado. Além disto, as Figuras 34 B e C mostram que enquanto as Mes controle foram capazes de recrutar mais células mononucleares para o espaço broncoalveolar, houve semelhança entre os números de células mononucleares e neutrófilos

recrutados mediante a liberação da PGE_2 das microesferas no ambiente pulmonar. Animais que receberam PBS pelo mesmo procedimento cirúrgico e foram tratados intranasalmente com o mesmo veículo não apresentaram recrutamento celular importante (dados não mostrados).

Figura 34. Número de células totais (A), mononucleares (B) e neutrófilos (C) recuperados do LBA de camundongos C57BL/6 14 dias após infecção com *H. capsulatum*. Os animais (5 por grupo) receberam intranasalmente microesferas controle ou contendo PGE₂ 1, 4, 7 e 10 após a infecção. As células foram identificadas por coloração panótica. Resultados expressos como sendo Média ± EPM; (n = 2 experimentos). **P* < 0,05, ****P* < 0,001, comparados com o grupo Infectado. #*P* < 0,05, ##*P* < 0,01, Mes_LTB₄ comparado com Mes_controle.

Avaliação da sobrevivência dos animais infectados com *H. capsulatum* que receberam microesferas controle ou contendo PGE₂

Após a análise do LBA dos camundongos C57BL/6 infectados, fomos investigar se o tratamento dos mesmos com as microesferas contendo PGE₂ foi capaz de modificar a sobrevivência durante o curso da infecção pelo fungo. A Figura 35 mostra a sobrevivência dos camundongos infectados com inóculo sub-letal do fungo *H. capsulatum* (5×10^5 lev./animal) e tratados intranasalmente com microesferas 1, 4, 7 e 10 dias após a infecção. Pudemos observar que todos os animais que foram infectados com o fungo e não tratados com as microesferas (C57BL/6 Infec) sobreviveram durante o período avaliado (60 dias). Com relação aos animais infectados e tratados com as Mes controle, estes apresentaram uma taxa de mortalidade de 50% somente a partir do 30º dia da infecção, permanecendo assim até o fim do período avaliado. Por outro lado, os animais infectados que foram tratados com as Mes PGE₂ apresentaram antecipação de suas mortalidades, quando comparados com os demais grupos. De maneira interessante, estes animais começaram a morrer a partir do 13º dia da infecção (50% de mortalidade).

Figura 35. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados intratraquealmente com 5×10^5 leveduras de *Histoplasma capsulatum*. Animais (6 por grupo) receberam as microesferas controle ou contendo PGE₂ 1, 4, 7 e 10 dias após a infecção. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; ($n = 2$ experimentos).

Quantificação de citocinas inflamatórias nos homogeneizados de pulmão dos camundongos C57BL/6 infectados e tratados com as microesferas

Com o objetivo de investigar o efeito da PGE₂ liberada das microesferas sobre a produção de citocinas inflamatórias pelas células dos pulmões dos animais C57BL/6 infectados com o fungo, quantificamos os níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-12 produzidos (Figura 36). Com relação aos níveis de TNF- α detectados, todos os animais infectados, tratados ou não com as microesferas foram capazes de induzir a produção da citocina, quando comparados com o grupo PBS (controle) (Figura 36 A). Ambos os grupos de animais tratados com as microesferas foram capazes de reduzir os níveis da citocina analisada. Porém, o grupo tratado com as Mes PGE₂ foi capaz de inibir a produção de TNF- α de maneira significativa, quando comparado com o grupo que recebeu as Mes controle. Já os níveis de IFN- γ detectados (Figura 36 B) mostraram que apenas o grupo infectado não tratado foi capaz de induzir a produção da citocina avaliada. Como observado para os níveis de TNF- α detectados, tanto os animais que receberam as Mes controle quanto aqueles que receberam as Mes PGE₂ foram capazes de inibir significativamente a produção de IFN- γ , quando comparados com o grupo apenas infectado. Além disto, os animais tratados com as microesferas contendo o mediador inibiram significativamente a produção da citocina, quando comparados com aqueles que receberam as Mes controle. A produção da citocina IL-12 também foi avaliada e a Figura 36 C mostra que todos os animais infectados foram capazes de aumentar significativamente os níveis da citocina, quando comparados com o grupo PBS. Por outro lado, apenas o grupo que foi tratado com as Mes PGE₂ foi capaz de inibir a produção de IL-12, quando comparado com o grupo apenas infectado. Além disto, os animais que receberam o mediador encapsulado foram capazes de inibir significativamente a produção da citocina, quando comparados com aqueles que receberam as Mes controle.

Figura 36. Produção de citocinas em homogeneizado de pulmão de camundongos C57BL/6 (5 por grupo) infectados com *H. capsulatum* e tratados com as microesferas. Concentrações de TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-12 (C) após 14 dias de infecção. Animais controle receberam 100 μ l i.t. de PBS estéril. Resultados expressos como sendo Média $\pm$ EPM; (n = 2 experimentos). * P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001, comparados com PBS. ## P < 0,01, ### P < 0,001, comparados com o grupo infectado de cada linhagem. & P < 0,05, && P < 0,01, &&& P < 0,001, Mes LTB₄ comparado com Mes controle.

Análise dos cortes histológicos dos pulmões dos animais C57BL/6 infectados e tratados com as microesferas

A histopatologia dos pulmões dos animais infectados com inóculo sub-letal de *H. capsulatum* e tratados ou não com as microesferas foi avaliada após 14 dias de infecção. Observamos, neste período, que o parênquima pulmonar dos animais apenas infectados ou infectados e tratados com as microesferas controle apresentaram comprometimento estrutural determinado pela presença de infiltrado de células inflamatórias (mononucleares e neutrófilos) (Figuras 37 A e C). Por outro lado, os animais que foram tratados com as microesferas contendo o mediador apresentaram melhor preservação da arquitetura pulmonar, visualizada pelo menor infiltrado celular no parênquima (Figura 37 E). Através da coloração pela prata (GMS), observamos que enquanto os animais apenas infectados ou infectados e tratados com Mes controle (Figuras 37 B e D) apresentaram quantidades consideráveis de leveduras distribuídas pelo tecido, os animais que foram tratados com as Mes PGE₂ (Figura 37 F) apresentaram redução no número de leveduras visualizadas. Correlacionando estes resultados com os obtidos das linhagens de camundongos 129 e 5-LO^{-/-}, observamos reduções evidentes tanto no número de células inflamatórias infiltradas no parênquima pulmonar quanto no número de leveduras visualizadas. Diante disto, ressaltamos que os animais C57BL/6 foram infectados com inóculo sub-letal do fungo para que pudéssemos avaliar o efeito da PGE₂ liberada das microesferas em antecipar a morte dos mesmos (Figura 35), inibindo recrutamento celular para o LBA (Figura 34) e produção de citocinas inflamatórias pelas células do pulmão (Figura 36).

Figura 37. Fotomicrografias de cortes histológicos representativos de pulmão de camundongos C57BL/6 infectados com *H. capsulatum* (A e B), tratados com Mes controle (C e D) e tratados com Mes PGE₂ (E e F). Os pulmões foram removidos 14 dias após a infecção. (A), (C) e (E), coloração HE; aumentos 50 e 400x. (B), (D) e (F), coloração GMS; aumentos de 50 e 1000x.

Discussão

Os resultados obtidos em nossos estudos, envolvendo os ensaios com diferentes tipos celulares, proporcionaram dados importantes e únicos no que se refere aos mecanismos de ação dos mediadores encapsulados e liberados das microesferas. Esta informação nos permitiu desvendar novas possibilidades para a aplicação destas formulações, especialmente em situação de terapia no modelo de infecção estudado nesta tese (histoplasmose murina).

Nos últimos anos, estudos referentes ao papel de leucotrienos nos processos infecciosos demonstraram não apenas a participação destes como mediadores quimiotáticos envolvidos no recrutamento celular, mas também como moduladores dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos pulmonares. Com relação à infecção pelo *H. capsulatum*, estudos conduzidos em nosso laboratório (MEDEIROS et al., 2004) demonstraram que, principalmente no 14º dia após a infecção, ocorre diminuição nos níveis de LTB₄ nos pulmões dos animais infectados com o fungo. Além disso, quando estes animais foram tratados com um inibidor da enzima 5-LO (MK 886), foi observado aumento da carga fúngica tanto no pulmão quanto no baço, evidenciado pela contagem de UFC recuperadas destes órgãos. Neste contexto, observamos em nossos ensaios de recrutamento celular para o LBA de camundongos infectados com *H. capsulatum* que o LTB₄ liberado das microesferas foi capaz de exercer sua atividade biológica ao recrutar para o espaço broncoalveolar tanto células mononucleares quanto neutrófilos. Este aumento no número de células recrutadas foi mais evidente nos animais 5-LO^{-/-} (Figura 28). Tal fato sugere que as Mes LTB₄ não só preservaram a atividade da molécula do mediador, conforme demonstrado, mas também proporcionaram a entrega do mesmo no ambiente pulmonar, durante o curso da infecção pelo fungo, recrutando e ativando células importantes no combate à infecção (células mononucleares e neutrófilos).

Tendo em vista os efeitos biológicos conferidos pela liberação do LTB₄ no ambiente pulmonar, demonstramos que até 7 dias após a administração das microesferas, o mediador liberado é capaz de recrutar células inflamatórias, especialmente neutrófilos, para o LBA dos camundongos 5-LO^{-/-}

(Figura 18 B). Por outro lado, camundongos 129 (selvagem), utilizados como animais que produzem endogenamente leucotrienos, infectados com o fungo, não apresentaram diferenças significativas com relação ao recrutamento celular quando tratados com as Mes LTB₄. Além disto, foi como se estes animais apresentassem uma resposta imune inadequada contra o fungo, quando comparados com os outros grupos infectados. A ação exógena do LTB₄, conferida pela administração das microesferas, foi responsável por aumentar a mortalidade dos animais tratados, conforme demonstrado pela curva de sobrevivência (Figura 29 A). Além de ter conferido uma ativação celular inapropriada ou exagerada no início da infecção, visto que estes animais são capazes de produzir endogenamente leucotrienos, podemos sugerir também que as microesferas, uma vez capazes de liberar o mediador intracelularmente, aumentaram a expressão de fatores nucleares, alvos da molécula de LTB₄, como por exemplo PPAR- α (Figura 17 B). Devchand et al., (1996) descreveram, pela primeira vez, que a via PPAR- α - LTB₄ está envolvida no controle da inflamação. Desta forma, uma possível ação anti-inflamatória pode ter ocorrido na fase inicial da infecção, prejudicando o estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra o fungo. Este efeito foi também evidenciado pelo aumento da produção de NO pelos macrófagos incubados com estas microesferas (Figura 17 A). Ainda com relação aos animais 129, os resultados obtidos das UFC recuperadas (14 dias) dos pulmões dos animais infectados e tratados com as microesferas mostraram que não houve diferença na redução da carga fúngica quando comparada com os animais apenas infectados (Figura 33). Correlacionando estes dados com os obtidos para os animais 5-LO^{-/-}, pudemos observar que nesta linhagem houve aumento significativo no número de UFC recuperadas, evidenciando o papel microbicida e protetor dos leucotrienos na histoplasmose murina. Além disto e de maneira interessante, quando estes animais infectados foram tratados com as Mes LTB₄ houve redução significativa no número de UFC recuperadas. Este ensaio foi realizado 14 dias após a infecção devido aos nossos conhecimentos prévios com relação ao curso da infecção pelo fungo. Nosso grupo demonstrou que neste período, os leucotrienos são importantes para o controle da disseminação do fungo, tanto nos pulmões quanto nos baços dos animais infectados (MEDEIROS et al., 2004). Além disto, no 14º dia após a infecção,

ocorre aumento na síntese de citocinas importantes para a modulação da resposta imune contra o fungo, especialmente TNF- α e IFN- γ . Com relação à participação de citocinas inflamatórias em infecções fúngicas, foi demonstrado que IL-12, TNF- α e IFN- γ estão envolvidas na resposta imune do hospedeiro contra leveduras intracelulares, como as de *H. capsulatum* (ALLEENDOERFER & DEEPE JR, 1997). Em nossos estudos, quando administramos as Mes LTB₄ em animais 129 infectados com o fungo não houve alteração na produção das citocinas avaliadas pelas células dos pulmões, quando comparados com aqueles apenas infectados. Por outro lado, animais 5-LO^{-/-} infectados que receberam esta formulação foram capazes de aumentar a produção das citocinas. Tal fato sugere a participação do LTB₄ na modulação da resposta imune, através da indução de citocinas inflamatórias importantes para o padrão de resposta (T_H1) contra o *H. capsulatum*. Estudos anteriores demonstraram que LTB₄ é importante para a produção de IL-2, IL-4, IL-12 e IFN- γ por linfócitos T (MORITA et al., 1999). Além disto, foi demonstrado que TNF- α induz recrutamento de neutrófilos via LTB₄ (CANETTI et al., 2001). Deepe Jr. et al., (2008) também demonstraram que bloqueando a ação de TNF- α durante o curso da infecção pelo *H. capsulatum*, em modelo murino, ocorre diminuição da imunidade protetora. Conjuntamente, estes resultados sugerem que o LTB₄ se faz necessário no início da infecção pelo fungo, pois ao ser liberado no ambiente pulmonar foi capaz de aumentar a produção destas citocinas, favorecendo o recrutamento e ativação de células mononucleares e neutrófilos, imprescindíveis para o controle da infecção. Neste contexto, nosso grupo demonstrou que estes tipos celulares têm um papel essencial no controle da infecção em modelo de histoplasmose disseminada (SÁ-NUNES et al., 2007).

Com relação às fotomicrografias provenientes dos cortes histológicos dos pulmões dos animais infectados, observamos que, conforme discutido anteriormente para o ensaio envolvendo a recuperação de UFC dos pulmões, os animais 5-LO^{-/-} apresentaram aumentos evidentes tanto no infiltrado celular inflamatório quanto no número de leveduras presentes no parênquima pulmonar. Porém, interessante, os animais desta linhagem que foram tratados com as Mes LTB₄ apresentaram redução evidente no número de

leveduras presentes no tecido quando comparados com os outros grupos (Figura 32 F). Tal fato sugere que o mediador liberado no ambiente pulmonar foi responsável também pela maior atividade microbida conferida aos macrófagos que fagocitaram as leveduras. Além disso, conforme demonstrado em nossos resultados (Figura 18 B), o LTB₄ liberado das microesferas é capaz de exercer um efeito tardio no recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar e estas células, por sua vez, podem auxiliar na fagocitose das leveduras alojadas no parênquima pulmonar. Novamente, não houve diferença evidente quando camundongos 129 infectados foram tratados com as microesferas (Figura 31). Conforme discutido anteriormente, os animais de ambas as linhagens que receberam as Mes controle também apresentaram evidente infiltrado de células inflamatórias no parênquima pulmonar.

A administração das microesferas contendo PGE₂ em animais infectados pelo fungo também nos revelou resultados interessantes com relação ao recrutamento celular para o LBA dos animais, à modulação da produção de citocinas inflamatórias e à sobrevivência dos mesmos. Estudos envolvendo os efeitos anti-inflamatórios e/ou supressores das prostaglandinas demonstraram que estas, inclusive a PGE₂, são capazes de inibir a produção de TNF- α e IL-1 por macrófagos estimulados com LPS (KUNKEL et al., 1986; KATSUYAMA et al., 1998). Nossos resultados estão de acordo com estes dados, uma vez que a PGE₂ liberada das microesferas foi capaz de inibir o recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar de camundongos infectados com o fungo (Figura 34), além de diminuir a produção de citocinas inflamatórias pelas células do pulmão (Figura 36). Além disto, conforme mostrado na Figura 35, os animais que foram tratados com as Mes PGE₂ tiveram sua mortalidade antecipada quando comparados com aqueles apenas infectados com o inóculo sub-letal do fungo. Tal fato sugere que o mediador liberado no ambiente pulmonar foi capaz de inibir a síntese de citocinas inflamatórias importantes para o controle da infecção, conforme discutido anteriormente. Desta maneira, a PGE₂ administrada exerceu um efeito anti-inflamatório prejudicial no início da infecção, levando os animais à morte, precocemente. Outro dado importante dos nossos estudos mostrado na Figura 37 é a evidente redução no número de leveduras presentes nos pulmões dos animais infectados quando estes foram tratados com as Mes

PGE₂, talvez devido à diminuição do infiltrado celular no parênquima, uma vez que as leveduras se encontram principalmente no interior dos macrófagos. Vale ressaltar que por se tratar de uma infecção com inóculo sub-letal do *H. capsulatum*, não se observam números elevados de leveduras como os encontrados nas análises histológicas dos animais 129 e 5-LO^{-/-} infectados.

Nossos dados envolvendo a administração de microesferas contendo LTB₄ como agente imunomodulador da resposta imune contra a infecção pelo *H. capsulatum* sugerem que o mediador liberado no ambiente pulmonar durante o curso da infecção foi importante para a manutenção de uma resposta imune mais eficiente nos animais 5-LO^{-/-} infectados. Com relação às microesferas contendo PGE₂, estas, apesar de terem favorecido a morte precoce dos animais, no início da infecção, foram importantes para o controle do recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar, bem como da produção de citocinas inflamatórias pelas células do pulmão. Estas características apresentadas por esta formulação lhe conferem utilidade em situação de terapia, especialmente para o controle de processos inflamatórios e/ou infecciosos exacerbados.

Abordando ainda os aspectos inerentes a cada formulação desenvolvida, vale ressaltar também que, em nossos estudos envolvendo a administração das microesferas controle em animais infectados, estas foram capazes de alterar perfis de recrutamento celular, síntese das citocinas inflamatórias e até mesmo, a sobrevivência dos animais 129 infectados. Com relação a este efeito inesperado, estudos demonstraram que microesferas de PLGA são capazes de, após contato com células dendríticas imaturas, induzir aumento na síntese de TNF- α , favorecendo a maturação das mesmas (YOSHIDA et al., 2007). Ainda com relação a estas microesferas, Zolnik et al., (2008) demonstraram que são capazes de promover recrutamento de células inflamatórias, quando administradas subcutaneamente em ratos.

Os estudos abordados neste trabalho revelaram achados interessantes e importantes quanto ao uso de microesferas biodegradáveis contendo mediadores lipídicos em situação de terapia. Nossos resultados nos conduzem, a partir deste momento, a outros estudos envolvendo a administração de formulações constituídas, por exemplo, de outros polímeros que possam minimizar possíveis efeitos de ativação celular. Além disto, abre-

se “um leque” de possibilidades envolvendo estas formulações associadas com quimioterápicos, como terapia em processos infecciosos.

5. CONCLUSÕES

1. O método de microencapsulação proposto atendeu aos objetivos do estudo, pois permitiu a confecção de microesferas biodegradáveis com características físico-químicas adequadas à liberação dos mediadores lipídicos no ambiente pulmonar;
2. As microesferas produzidas foram capazes de preservar a atividade biológica dos mediadores encapsulados, conforme demonstrado pelos ensaios conduzidos;
3. As microesferas contendo LTB₄ configuraram uma formulação capaz de modular a ativação de diferentes tipos celulares. No modelo de histoplasmose estudado, quando administradas em camundongos 5-LO^{-/-} infectados, foram capazes de tornar a resposta imune contra o fungo mais eficiente;
4. As microesferas contendo PGE₂, por sua vez, exerceram tanto atividade anti-inflamatória e/ou imunossupressora quanto pró-inflamatória nos tipos celulares estudados. Quando administradas em animais infectados com *H. capsulatum*, foram capazes de inibir recrutamento celular e síntese de citocinas inflamatórias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Méthodes de preparation des microparticules biodégradables chargées en principes actifs hydrosolubles, S.T.P. **Pharma Sci.**, v 2, p. 365-380, 1992.

ALLEENDOERFER, R. & DEEPE JR, G. S. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. **Infect Immun.**, v. 65, p. 2564–2569, 1997.

ALLEENDOERFER, R., BRUNNER, G.S. & DEEPE, JR. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. **J Immunol.**, v. 162, p. 7389-7396, 1999.

ARTZ, R. P.; BULLOCK, W. E. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: lymphoid organ histopathology and serological studies. **Infect Immun.** v. 23, p. 884-892, 1979.

BACK, M.; BU, D. X.; BRANSTROM, R.; SHEIKIN, E. Y.; YAN, Z. Q.; HANSSON, G. K. Leukotriene B₄ signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 17501-17506, 2005.

BAILIE, M.B.; STANDIFORD, T.J.; LAICHALK, L.L.; COFFEY, M.J.; STRIETER, R.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. **J Immunol.**, v. 157, p. 5221-5224, 1996.

BAZILE D.V.; ROPERT C.; HUVE P.; VERRECHIA T.; MARLAND M.; FRYDMAN A.; VEILLARD M.; SPENLEHAUER G. Body distribution of fully biodegradable 14C-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. **Biomaterials**, v. 13, p. 1093-1102, 1992.

BORGER, P.; VELLENGA, E.; GRINGHUIS, S. I.; TIMMERMAN, J. A.; LUMMEN, C.; KAUFFMAN, H. F. Prostaglandin E₂ differentially modulates IL-5 gene expression activated human T lymphocytes depending on the costimulation signal. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 101, p. 231-240, 1998.

BUREAU, M. F.; BARBOSA DE CASTRO, C.; CORTESE, C.; BACHELET, M.; BORIS VARGAFTIG, B. 5-Lipoxygenase and endotoxin-induced microvascular albumin exchanges and leukocyte recruitment in guinea-pigs lungs. **Eur J Pharm.**, v. 324, p. 89–98, 1997.

BURET, A.; CRIPPS, A. W. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis. **Am Rev Respir Dis.**, v. 148, p. 793-805, 1993.

BUSTOS, M.; COFFMAN, T. M.; SAADI, S.; PLATT, J. L.. Modulation of eicosanoid metabolism in endothelial cells in a xenograft model: role of cyclooxygenase-2. **J Clin Invest.**, v 100, p. 1150, 1997.

CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, p.175-177, 1979.

CAMACHO, M. J.; LOPEZ-BELMONTE, J.; VILA, L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. **Circ Res.**, v 83, p. 353, 1998.

CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B4 mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol.**, v. 134, p. 1619-1628, 2001.

CASILLAN, A. J.; GONZALEZ, N. C.; JOHNSON, J. S.; STEINER, D. R.; WOOD, J. G. Mesenteric microvascular inflammatory responses to systemic hypoxia are mediated by PAF and LTB4. **J Appl Physiol.**, v. 94, p. 2313-2322, 2003.

CAUGHEY, G. E.; CLELAND, L. G.; PENGLIS, P. S.; GAMBLE, J. R.; JAMES, M. J. Roles of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. **J Immunol.**, v.167, p. 2831-2838, 2001.

CHACE, J. H; FLEMING, A. L.; GORDON, J. A.; PERANDONES, C. E.; COWDERY, J. S. Regulation of differentiation of peritoneal B-1a (CD5+) B cells: activated peritoneal macrophages release prostaglandin E₂, which inhibits IgM secretion by peritoneal B-1a cells. **J Immunol.**, v. 154, p.5630-5636, 1995.

CHAMPION, J. A.; WALKER, A.; MITRAGOTRI, S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres. **Pharm Res.**, v. 25(8), p. 1815-1821, 2008.

CHEN, D. B.; YANG, T. Z.; LU, W. L.; ZHANG, Q. *In vitro* and *in vivo* study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel, **Chem Pharm Bull.** v. 49, p.1444–1447, 2001.

CHEN, N.; RESTIVO, A.; REISS, C. S. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. **J Neuroimmunol.**, v. 120, p.94-102, 2001.

COHEN, S.; ALONSO, M. J.; LANGER, R. Novel approaches to controlled release antigen delivery. **Int J Technol Assessment Health Care** , v. 10, p. 121-130, 1994.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; NETTO, C. F.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals. **Mycopathologia**, v. 125, p. 19-22, 1994.

DE ROSE, V.; TRENTIN, L.; CRIVELLARI, M. T.; CIPRIANI, A.; GIALDRONI GRASSI, G.; POZZI, E.; FOLCO, G.; SEMENZATO, G. Release of prostaglandin E2 and leukotriene B4 by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. **Thorax**, v. 52, p. 76-83, 1997.

DEEPE Jr, G. S. AND BULLOCK, W. E. Immunological aspects of fungal pathogenesis. **Eur J Clin.**, v. 9, p. 567-579, 1990.

DEEPE JR, G.S. Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. **J Immunol.**, v. 152, p. 3491-3500, 1994.

DEEPE JR., G.S.; GIBBONS, R.; WOODWARD, E. Neutralization of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. **J Immunol.**, v. 163, p. 4985-4993, 1999.

DEEPE JR., G.S. & GIBBONS, R.S. TNF- α Antagonism Generates a Population of Antigen-Specific CD4⁺CD25⁺ T Cells That Inhibit Protective Immunity in Murine Histoplasmosis. **J. Immunol.**, v. 180(2), p. 1088-1097, 2008.

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

EIERMAN, D. F.; YAGAMI, M.; ERME, S. M.; MINCHEY, S. R.; HARMON, P. A.; PRATT, K. J.; JANOFF, A. S. Endogenously opsonized particles divert prostanoid action from lethal to protective in models of experimental endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, v. 92, p. 2815– 2819, 1995.

ELDRIDGE, J. H.; STAAS, J. K.; MEULBROEK, J. A.; TICE, T. R.; GILLEY, R. M. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Molec Immun.**, v. 28, p. 287-294, 1991.

EVORA, C.; SORIANO, I.; ROGERS, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; HANES, J.; LANGER, R. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,1-dipalmitoylphosphatidylcholine. **J Control Release**, v. 51, p. 143-152, 1998.

FACCIOLI, L. H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F. M.; SEHMI, R.; KAY, A. B.; WILLIAMS, T. J. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, *in vivo*. **Immunology**, v. 73, p. 222-227, 1991.

FLAMAND, L.; BORGEAT, P.; LALONDE, R.; GOSSELIN, J. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B₄ to humans. **J Infect Dis.**, v. 189, p. 2001-2009, 2004.

FRANCO, L.H.; WOWK, P.F.; SILVA, C.L.; TROMBONE, A.P.; COELHO-CASTELO, A.A.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; MORETTO, E.L.; BONATO, V.L. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein

differentially activates human macrophages and dendritic cells. **Genet Vaccines Ther.**, v. 21; 6(1):3, 2008.

GABOURY, J.; WOODMAN, R. C.; GRANGER, D. N.; REINHARDT, P.; KUBES, P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. **Am J Physiol.**; v. 265, p. 862-8677, 1993.

GEZE, A.; VENIER-JULIENNE, M. C. D.; MATHIEU, R.; FILMON, R.; PHANTAN-LUU, BENOIT, J.P. Development of 5-iodo-2-deoxyuridine milling process to reduce initial burst release from PLGA microparticles, **Int J Pharm.**, v. 178, p. 257– 268, 1999.

GILDING D. M., REED, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery. Poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers. **Polymer**, v. 20, p. 1459-1464, 1979.

GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N.; CAETANO, F. H.; LUNARDI, L. O.; MACHADO, A. E. H. Phagocytosis of PLGA Microparticles in Rat Peritoneal Exudate Cells: A Time-Dependent Study. **Microsc Microanal.**, v. 12, p. 399-405, 2006.

GOMEZ, P. F.; PILLINGER, M. H.; ATTUR, M.; MARJANOVIC, N.; DAVE, M.; PARK, J.; BINGHAM, C. O.; MUSSAWIR, H. A.; ABRAMSON, S. B. Resolution of Inflammation: Prostaglandin E2 Dissociates Nuclear Trafficking of Individual NF- κ B Subunits (p65, p50) in Stimulated Rheumatoid Synovial Fibroblasts. **J Immunol.**, v. 175, p. 6924-6930, 2005.

GOSSELIN, J.; SAVARD, M.; TARDIF, M.; FLAMAND, L.; BORGEAT, P. Epstein-Barr virus primes human polymorphonuclear leucocytes for the biosynthesis of leukotriene B4. **Clin Exp Immunol.**, v. 126, p. 494-502, 2001.

GOTO, T.; HERBERMAN, R. B.; MALUISH, A.; STRONG, D. M. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. **J. Immunol.**, v. 130, p. 1350-1355, 1983.

HENNET, T.; ZILTENER, H. J.; FREI, K.; PETERHANS, E. A. Kinetic study of immune mediators in the lungs of mice infected with influenza A virus. **J. Immunol.**, v. 149, p. 932-939, 1992.

HIGUCHI, T. **J Pharm Sci.**, v. 59, p. 353, 1970.

HOPKINS, H.; STULL, T.; VON ESSEN, S. G.; ROBBINS, R. A.; RENNARD, S. I. Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia. **Chest**, v. 95, p. 1021-1027, 1989.

HOUSE, S. D. & LIPOWSKY, H. H. Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. **Microvasc Res.**, v. 34, p. 363-379, 1987.

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Invest.**, v. 52, p. 2745-2756, 1973.

KASIRGA, E.; COKER, I.; AYDOGDU, S.; YAGCI, R. V.; TANELI, B.; GOUSSEINOV, A. Blood levels of leukotrienes (LTC₄, D₄, E₄, B₄) and synthesis of leukotriene B₄ by peripheral leukocytes in children with acute A and B hepatitis. **Turk J Pediatr.**, v. 41, p. 457-465, 1999.

KATAMURA, K.; SHINTAKU, N.; YAMAUCHI, Y.; FUKUI, T.; OHSHIMA, Y.; MAYUMI, M.; FURUSHO, K. Prostaglandin E₂ at priming of naïve CD₄⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN- γ and IL-12, but not IL-4 and IL-5. **J Immunol.**, v. 155, p. 4604-4612, 1995.

KATSUYAMA, M.; IKEGAMI, R.; KARAHASHI, H.; AMANO, F.; SUGIMOTO, Y. AND ICHIKAWA, A. Characterization of the LPS-Stimulated Expression of EP2 and EP4 Prostaglandin E Receptors in Mouse Macrophage-like Cell Line, J774.1. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 251, p. 727-731, 1998.

KLIMPEL, K. R.; GOLDMAN, W. E. Isolation and characterization of spontaneous avirulent variants of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun.**, v. 55, p. 528-533, 1987.

KUNKEL, S. L.; CHENSUE, S. W.; PHAN, S. H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. **J Immunol.**, v. 136, p. 186-92, 1986.

KURODA, E.; SUGIURA, T.; ZEKI, K.; YOSHIDA, Y.; YAMASHITA, U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E₂ among mouse strain: a possible mechanism to polarize Th₂ type response in BALB/c mice. **J Immunol.**, v. 164, p. 2386-2395, 2000.

LACASSE, F. X.; FILION, M. C.; PHILIPS, N. C.; ESCHER, E.; MCMULLEN, J. N.; HILDGEN, P. Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein adsorption and phagocytosis. **Pharm Res.**, v. 15, p. 312-317, 1998.

LANE, T. E.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infect Immun.**, v. 61, p. 1468-1473, 1993.

LARFARS, G.; LANTOINE, F.; DEVYNCK, M. A.; PALMBLAD, J.; GYLLENHAMMAR, H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B₄, C₄, and D₄ in human polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 93, p. 1399-1405, 1999.

LARSON, R. S. & SPRINGER, T. A. Structure and function of leukocyte integrins. **Immunol Reviews**, v. 114, p. 181-217, 1990.

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

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. **J Clin Invest.**, v. 73, p. 889-997, 1984.

LIMA, K. M. & RODRIGUES JUNIOR, J. M. Poly-dl-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. **Braz J Med Biol Res.**, v 32, p. 171-180, 1999.

LIMA, K. M.; SILVA, C. L.; RODRIGUES JUNIOR, J. M. Microesferas biodegradáveis: uma nova alternativa para administração de vacinas de DNA. **Biotecnologia**, v.12, p. 10-13, 2000.

LIMA, V. M.; BONATO, V. L.; LIMA, K. M.; SANTOS, S. A.; SANTOS JÚNIOR, R. R.; GONCALVES, E. D.; FACCIOLI, L. H.; BRANDÃO, I. T.; RODRIGUES JUNIOR, J. M.; SILVA, C. L. Role of trehalose in recruitment of cells and modulation of production of cytokines in tuberculosis. **Infec Immun.**, v. 69(9), p. 01-08, 2001.

LIMA, K. M.; SANTOS, S. A.; LIMA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A.; RODRIGUES, J. M. Jr.; SILVA, C. L. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene Ther.**, v. 10, p. 678-685, 2003.

LINDBOM, L.; XIE, X.; RAUD, J.; HEDQVIST, P. Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling. **Acta Physiologica Scandinavica**; v. 146, p. 415–421, 1992.

LOHMANN-MATTHES, M. L.; STEINMULLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **Eur J Respir.**, v. 7, p. 1678-1689, 1994.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **J Immunol.**, v. 175, p. 3892-3899, 2005.

MANCA, M.L.; MOURTAS, S.; DRACOPOULOS, V.; FADDA, A.M.; ANTIMISIARIS, S.G. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery? A comparative study of particle stability during nebulization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** , v. 62, p. 220–231, 2008.

MEDEIROS, A. I.; SILVA, C. L.; MALHEIRO, A.; MAFFEI, C. M.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live

Histoplasma capsulatum or by the beta-glucan present in their cell wall. **Br J Pharmacol.**, v. 128, p. 1529-1537, 1999.

MEDEIROS, A. I.; SÁ-NUNES, A.; SOARES, E. G.; PERES, C. M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun.**, v. 72, p. 1637-1644, 2004.

MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G. S.; PAINTER, A.; TRAVIS, S. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun.**, v.55, p. 1355-1358, 1987.

MORIN, C.; BARRAT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Biodegradable nanocapsules containing a lipophilic immunomodulator: drug retention and tolerance towards macrophages *in vitro*. **J Drug Target.**, v. 1, p. 157-164, 1993.

MORITA, H.; TAKEDA, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Immunosuppressive effect of leukotriene B(4) receptor antagonist *in vitro*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 264, p. 321-326, 1999.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th₁, Th₂ and more. **Immunol Today**, v. 17, p. 138-146, 1986.

MÜLLER, R. H.; RUHI, D.; LUCK, M.; PAULKE, B. R. Influence of fluorescent labelling of polystyrene particles on phagocytic uptake, surface hydrophobicity and plasma protein adsorption. **Pharm. Res.**, v. 14, p. 18-24, 1997.

MURPHY, J. W.; WU-HSIEH, B. A.; SINGER-VERMES, L. M.; FERRANTE, A.; MOSER, S.; RUSSO, M.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; CALICH, V. L.; KOWANKO, I. C., et al. Cytokines in the host response to mycotic agents. **J Med Vet Mycol.**, v. 32, p. 203-210, 1994.

NAKAYAMA, T.; MUTSUGA, N.; YAO, L.; TOSATO, G. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. **J Leukoc Biol.**, v. 79, p. 95-104, 2006.

NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T.; KUNOU, N.; KAWASHIMA, Y. Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with dl-lactide/glycolide copolymer by a novel emulsification solvent diffusion method, and drug release behavior. **J Contr Release**, v. 25, p. 89-98, 1993.

NOVERR, M. C.; PHARE, S. M.; TOEWS, G. B.; COFFEY, M. J.; HUFFNAGLE, G. B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. **Infect Immun.**, v. 69, p. 2957-2963, 2001.

NOVERR, M. C.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. **Infect Immun.**, v. 70, p. 400-402, 2002.

O'HAGAN, D. T.; JEFFERY, H.; DAVIS, S. S. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. **Vaccine**, v. 11, p. 965-969, 1993.

O'BYRNE, P. M.; ISRAEL, E.; DRAZEN, J. M. Antileukotrienes in the treatment of asthma. **Ann Intern Med.**, v. 127, p. 472-478, 1997.

PANZER, U. & UGUCCIONI, M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. **Eur J Immunol.**, v. 34, p. 3682-3689, 2004.

PETERS-GOLDEN, M. & COFFEY, M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. **J Lab Clin Med.**, v. 132, p. 251-257, 1998.

QIU, H.; JOHANSSON, A. S.; SJÖSTRÖM, M.; WAN, M.; SCHRÖDER, O.; PALMBLAD, J.; HAEGGSTROM, J. Z. Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B₄. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 6913-6918, 2006.

RUDT, S. & MULLER, R. H. *In vitro* phagocytosis assay of nano- and microparticles by chemiluminescence: Effect of analytical parameters, particle size and particle concentration. **J Control Release**, v. 22, p. 263-272, 1992.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Adv Prost Thromb Leuk Res.**, v. 11, p.1-13, 1983.

SÁ-NUNES, A.; MEDEIROS, A.I.; SORGI, C.A; SOARES, E.G.; MAFFEI, C.M.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Gr-1+ cells play an essential role in an experimental model of disseminated histoplasmosis. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1393-13401, 2007.

SCHAFER, S. C.; SEHRT, D. N.; KAMLER, M.; JAKOB, H.; LEHR, H. A. Paradoxical attenuation of leukocyte rolling in response to ischemia-reperfusion and extracorporeal blood circulation in inflamed tissue. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 289, p. 330-335, 2005.

SHAK, S.; PEREZ, H. D.; GOLDSTEIN, I. M. A novel dioxygenation product of arachidonic acid possesses potent chemotactic activity for human polymorphonuclear leukocytes. **J Biol Chem.**, v. 258, p.14948-14953, 1983.

SILVA, C. L., LIMA, K. M, RODRIGUES JUNIOR, J. M., FACCIOLI, L. H., BONATO, V. L. DNA vaccines for the prevention and treatment of tuberculosis. **Ann Rev Biom Science**, v. 2, p. 39-59, 2000.

SNIJDEWINT, F. G.; KALINSKI, P.; WIERENGA, E. A.; BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. Prostaglandin E₂ differentially modulates cytokine secretion of human T helper lymphocytes. **J Immunol.**, v. 150, p. 5321-5329, 1993.

TABATA, Y. & IKADA, Y. Phagocytosis of polymeric microspheres. In: SZYCHER, M. **High Performance Biomaterials**. (Ed.), Lancaster, Technomic Publishing, 1991. p. 621-646.

TAGER, A. M.; BROMLEY, S. K.; MEDOFF, B. D.; ISLAM, S. A.; BERCURY, S. D.; FRIEDRICH, E. B.; CARAFONE, A. D.; GERSZTEN, R. E.; LUSTER, A. D. Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nat Immunol.**, v. 4, p. 982-990, 2003.

TINEKE, C. T. M.; KRAAN, V. D. P.; BOEIJE, L. C. M.; SMEENK, R. J. T.; WIJDENES, J.; AARDEN, L. A. Prostaglandin E₂ is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **J Exp Med.**, v. 181, p. 775-779, 1995.

WELKOS, S. & O'BRIEN, A. Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. **Methods Enzymol.**, v. 235, p. 29-39, 1994.

WU, C. Y.; WARIG, K.; MCDYER, J. F.; SEDER, R. A. Prostaglandin E₂ and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. **J Immunol.**, v. 161, p. 2723-2730, 1998.

WU, X. S. Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Wise, D. L. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**. Nova Iorque, Marcel Dekker, 1995, p. 1015-1054.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y.; SHIMIZU, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. **Nature**, v. 387, p. 620-624, 1997.

YOSHIDA, M.; MATA, J.; BABENSEE, J.E. Effect of poly(lactic-co-glycolic acid) contact on maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 80(1), p. 7-12, 2007.

YOSHINO, S. Patterns of prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ production in inflammation induced by peptidoglycan-polysaccharide polymers of bacterial cell wall. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 18, p. 137-144, 1995.

ZOLNIK, B.; BURGESS, D. J. Evaluation of in vivo–in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. **J Control Release.**, v. 127, p. 137-145, 2008.

ZURIER, R. B. & QUAGLIATA, F. Effect of prostaglandin E₁ on adjuvant arthritis. **Nature**, v. 234, p. 304–305, 1971.