

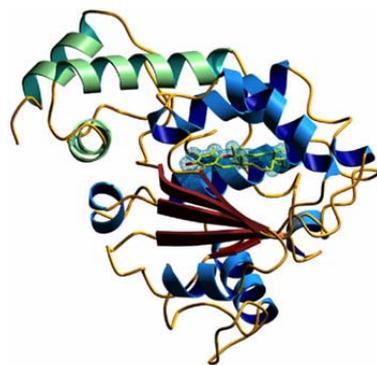


FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**VITAMINA E: CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO LPS E RELAÇÃO COM O RECEPTOR
NUCLEAR PPAR γ**



Rio de Janeiro

Abril/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**VITAMINA E: CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO LPS E RELAÇÃO COM O RECEPTOR
NUCLEAR PPAR γ**

BÁRBARA D’ALEGRIA SILVA

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área
de Imunologia e Farmacologia**

ORIENTADORES: Adriana Ribeiro Silva

Hugo Caire Castro Faria Neto

Rio de Janeiro

Abril/2007



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Folha de Aprovação

Banca Examinadora

Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins

Presidente - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Célio Freire de Lima

Membro - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Fernanda Jurema Medeiros

Membro - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Clarissa Maya Monteiro

Suplente - Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Patrícia Pacheco

Suplente - Fundação Oswaldo Cruz

Aos meus pais, Marcos e Dalva, a irmã Débora
e ao meu noivo Rafael, por todo amor,
carinho e paciência que proporcionaram
este momento tão importante

O Teu alimento será o Teu remédio

HIPÓCRATES

AGRADECIMENTOS

A Deus, que no mistério de sua santíssima trindade e no seu amor incontestável, permitiu-me a vida, renovando-a sempre, e fazendo com que eu amadurecesse profissional, pessoal e espiritualmente nesse período. Por todos os desencontros que, no final, consegui entender que são encontros. Por me colocar nos locais certos, na hora certa. Por sua presença, que sinto o tempo todo comigo.

Aos meus pais, Marcos Antônio e Dalva D'Alegria, por todo sacrifício que permitiu que eu chegasse até aqui. Por me colocarem “no colo” em todos os momentos difíceis, por serem mais que pais, mas grandes amigos. Por serem responsáveis pela criação desta família tão maravilhosa que temos e que é o meu porto seguro. Pelo amor e apoio incondicionais que só os pais conseguem oferecer aos seus filhos.

A Débora D'Alegria, que além de ser minha melhor amiga, tenho a felicidade de tê-la como irmã. Por todo o incentivo que sempre me deu, pelas horas de conversa, e também pela grande contribuição nas figuras dessa dissertação.

A Rafael Leite, meu noivo, único e tão especial, que não me imagino mais sem sua presença. Por me incentivar na vida acadêmica e entender com grande carinho todos os momentos em que eu estive ausente, confortando-me ao dizer que temos a eternidade.

A minha grande amiga e orientadora Adriana Ribeiro Silva, a nossa Drica, que me aceitou de braços abertos no laboratório, mesmo sem eu nunca ter feito algum tipo de ensaio experimental. Por abraçar a idéia da vitamina E e pelo apoio em todos os momentos difíceis que passamos juntas no período em essa dissertação foi desenvolvida, que foram muitos. Por me receber em sua casa em plena licença-maternidade para conversas mais pessoais do que profissionais e com isso, conseguir estar presente em todos os meus desafios. O meu muito obrigada e a minha promessa de lealdade e também de manter nosso padrão de qualidade na pesquisa!

Ao meu grande chefe e orientador Hugo Caire de Castro Faria Neto por também me receber no laboratório e por deixar em minhas mãos um grande projeto na pesquisa em sepse, projeto este que ainda cuido com muito carinho e anseio por ver seus resultados em breve. Por nos incentivar e quebrar todo aquele estereótipo de chefe de laboratório e permitir com isso um contato informal, tão importante para o andamento dos trabalhos. Por incentivar o meu mais novo plano profissional, ainda que seja fora do laboratório.

A Dra. Patrícia Torres Bozza, tão orientadora quanto, a quem eu admiro muito e também me espelho nessa carreira tão desafiadora que é a pesquisa. Por abrir as portas do laboratório e também por confiar a mim alguns experimentos de seu interesse, permitindo assim colaborações importantes.

A Dra. Clarissa Maya Monteiro, pela revisão deste trabalho e também pela orientação em muitos momentos desse projeto. Pelo seu famoso “nãooo”, permitindo sempre maior atenção nos experimentos mais delicados, como os westerns. E é claro, pela amizade, pelas caronas até Botafogo, pelos conselhos e principalmente, por todo carinho a mim dispensado nesses três anos em que estou no laboratório.

Ao meu grande presente, que ganhei no meu último ano de mestrado, Clarissa Campbell Menezes, por ter se tornado uma grande amiga e por ser meu braço direito nos experimentos. Por me incentivar naqueles momentos tão complicados quando os experimentos não funcionam por repetidas vezes. Pelas caronas até o metrô, mesmo saindo do seu caminho de casa. Enfim, por me ajudar tão fielmente na conclusão desse trabalho.

A Andressa Luíza, nossa lindona, por me ensinar os experimentos com aorta de coelho, meus primeiros no laboratório e por me ensinar a prática de gavagem. Por todas as vezes que ou saiu mais tarde ou chegou mais cedo no laboratório só para me dar uma “ajudinha”, mas que na verdade foram momentos de grande ajuda, mostrando que companheirismo e amizade são também palavras essenciais na pesquisa. Enfim, por todos os momentos alegres que nos proporciona no nosso dia-a-dia!

A Dra. Rachel Novaes Gomes, pelas dicas dos ELISAs, por me ensinar o CLP e principalmente, por todas as nossas conversas e conselhos em momentos um tanto complicados, contribuindo assim para o meu amadurecimento dentro do laboratório. Sem dúvida, por sua alegria, capaz de contagiar até mesmo o mais sisudo dos homens!

A Dra. Patrícia Pacheco, pelas grandes risadas que deixam o laboratório mais divertido e aliviam a pressão do nosso dia-a-dia! Pelas dicas dos EIA's e por aceitar minha participação em alguns de seus experimentos, o que me permitiu uma colaboração muito importante dentro do laboratório.

A Rose Branco, pelo profissionalismo que permite ao laboratório estar sempre funcionando, sem faltar material ou qualquer outro suprimento básico para o nosso trabalho, mesmo com tantas atividades para mantê-lo em ordem.

Aos amigos do laboratório, Daniele Nascimento, pelas caronas até o metrô tarde da noite, pelas risadas no laboratório e pela amizade; Patrícia Elaine de Almeida, por compatilhar os percalços dos westerns e também pelo seu carinho e atenção. Liliane Rosa, por me salvar em alguns dos meus experimentos e pela amizade; Rafael Cardoso, pelos muitos momentos de descontração na sala 27 e pelo ajuda com o biotério; Cassiano e Kelly Grace Magalhães, pelas trocas de experiências nos experimentos que não dão certo e também, pelo carinho; Ao Fábio “Marmo”, sem dúvida pela amizade e companheirismo nesses dois últimos anos. Ao Fábio Amendoeira, grande “nutri”, pela amizade e conselhos! À Dra. Helóisa D'Ávila e a

Cristiane Zanon, minhas grandes “vizinhas”, pela amizade, pelos momentos de descontração na volta para casa e é claro, por toda ajuda no dia-a-dia do laboratório. A todos os alunos de iniciação científica, Natália, Diogo, Aline, Renata, Michele, Daiane, Giselle, Tammy, Naiara e Vivian pela ajuda e pela alegria que transmitem ao nosso dia-a-dia.

Ao Dr. Válber Frutuoso e às Dra.s Adriana Vieira e Patrícia Reis, à Andréa Surrage e à Alessandra, por todo carinho e incentivo e pela ajuda no dia-a-dia no laboratório.

Aos demais componentes do grupo sepse, Fernando Bozza, Pedro Azambuja, Renata Carnevale, Rodrigo Amâncio e André Japiassú, pelas grandes conversas nas reuniões de 3^a. feira que sempre me permitiram uma maior visão do mundo clínico e das pesquisas relacionadas ao mesmo, pela qual tomei um gosto especial e pretendo investir futuramente.

Aos bioteristas do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Nelson, Edson e Ubiratan, por cuidarem sempre de forma exemplar de nossos animais.

A Dra. Fernanda Medeiros, professora da Escola de Nutrição da UNIRIO, pela amizade, pela minha primeira oportunidade profissional, pelo incentivo ao mestrado e à carreira acadêmica, e por me mostrar que é possível sim fazer um trabalho de qualidade em um hospital com tantos recursos limitados. Por todas às vezes que tive que me ausentar do HUGG e por entender e apoiar quando tive que me ausentar definitivamente para me dedicar ao mestrado. Por ensinar mais do que nutrição, mas o respeito aos pacientes.

Ao Dr. Pedro Portari, professor da Escola de Medicina e Cirurgia da UNIRIO, por também acreditar no meu primeiro ensaio clínico, que culminou com a minha primeira oportunidade profissional. Pelos grandes ensinamentos que tive no dia-a-dia do HUGG, por nos fazer acreditar que podemos ir bem mais longe. Por compreender e apoiar minha opção pelo mestrado, mesmo com tantos assuntos pendentes no HUGG. Sem dúvida, pela amizade.

À amiga Célia Cohen, por dividir momentos tão importantes e difíceis nos corredores do Gaffrée e por “segurar” as pontas todas as vezes que tive que me ausentar devido aos meus experimentos no laboratório. Por todas as nossas longas conversas, ainda que pelo telefone, que me colocavam a par dos acontecimentos e com isso, permitiram que mesmo de longe, eu pudesse continuar colaborando nas pesquisas do HUGG.

As amigas Sandra Barbosa, Paula Moreira, Thaís Matsue, Emília Marreiro, Nataccia Nicolau e Patrícia Bertoni, pela amizade de anos, por todas às vezes que me escutaram falar sobre a vitamina E e o PPAR γ e, principalmente, por estarem presentes em momentos difíceis e por entenderem minha ausência em momentos importantes.

Às agências de fomento, FAPERJ, CNPq, ao programa PEW LATIN FELLOWS, e a FIOCRUZ, por todo o suporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.1 – Principais estruturas com atividade de vitamina E
- Figura 1.2 – Detalhes da cadeia carbônica das estruturas de vitamina E
- Figura 1.3 – Absorção intestinal e distribuição da vitamina E
- Figura 1.4 – Principais vias de sinalização envolvidas na regulação da atividade do PPAR γ
- Figura 1.5 – Estrutura dos principais ligantes e transcrição gênica pelo PPAR γ
- Figura 1.6 – Estrutura química da endotoxina de bactéria gram negativa (LPS)
- Figura 3.1 – Desenho dos plasmídeos utilizados nos experimentos de transfecção
- Figura 3.2 – Ensaio de transfecção
- Figura 3.3 – A transfecção com o gene repórter CD36-luciferase
- Figura 4.1 – D- α -tocoferol modula o acúmulo peritoneal de neutrófilos induzido pelo LPS
- Figura 4.2 – Análise de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória do LPS
- Figura 4.3 – O antagonista de GW 9662 inibe o acúmulo peritoneal de neutrófilos induzido pelo LPS.
- Figura 4.4 – O agonista do receptor nuclear PPAR γ , rosiglitazona, aumenta o número de neutrófilos na cavidade peritoneal e potencializa a neutrofilia sanguínea na peritonite aguda induzida pelo LPS.
- Figura 4.5 – D- α -tocoferol antagoniza os efeitos do PPAR γ *in vitro*
- Figura 6.1 – Esquema conclusivo
- Tabela 1.1 – Quantidade de vitamina E em determinados alimentos
- Tabela 1.2 – Principais ligantes dos PPARs.

LISTA DE ABREVIATURAS

UI	Unidades Internacionais
SR-B1	Receptor scavenger do tipo B1
α -TTP	Proteína transferidora de α -tocoferol
TAP	Proteína associada ao tocoferol
SEC14	Proteína
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PKC	Proteína kinase C
LTB4	Leucotrieno B4
PGE2	Prostaglandina E2
NSAIDs	Drogas antiinflamatórias não-esteróidas
CD36	Receptor Scavenger CD36
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas isoforma γ
RXR	Receptor
PPRE	Elemento responsivo aos proliferadores de peroxissomas
15d-PGJ2	15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J ₂
azPC	Azeloilfosfatidilcolina
COX-2	Ciclooxigenase-2
MAP-Kinase	Quinases ativadas por mitógenos
JNK	Quinase Jun N-terminal
NF κ B	Fator nuclear kappa B
AP-1	Ativador de proteína-1
STAT-1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i> ou Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
LBP	Proteína ligante de lipopolissacarídeo
TLR	Toll-like receptor
IL-1 β	Interleucina 1 β
MHCII	Complexo de histocompatibilidade II
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i> ou molécula de adesão à célula vascular 1
ECAM-1	<i>endothelial cell adhesion molecule</i> ou molécula de adesão à célula endotelial
IL-8	Interleucina 8
KC	Keratinocyte-derived chemokine
PAF	Platelet-activated factor ou fator de agregação plaquetária
5-LO	5-lipoxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-3	Ciclooxigenase-2
i.v.	intravenoso
PLA2	Fosfolipase A 2
PAF-AH	PAF-acetilhidrolase
CLP	Cecal Ligation and puncture
PBS	Solução salina tamponada
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
12-HETE	ácido 12-hidroeicosatetraenóico
15-HETE	ácido 15-hidroeicosatetraenóico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato ácido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
KH ₂ PO ₄	Fosfato ácido de potássio
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
BSA	Albumina bovina

RESUMO

A vitamina E, termo genérico utilizado para descrever um grupo de moléculas lipossolúveis estruturalmente relacionadas (tocoferóis e tocotrienóis), é um dos mais importantes antioxidantes conhecidos e tem sido investigada na inflamação não só por sua capacidade antioxidante *per se*, mas também porque funções celulares adicionais coexistem com a primeira função. No entanto, dependendo da dose administrada, o α -tocoferol pode apresentar efeitos antagônicos *in vitro*. Sabe-se que o PPAR γ , receptor nuclear envolvido na transcrição de genes da resposta inflamatória, pode estar relacionado aos efeitos do α -tocoferol, mas detalhes dessa regulação são desconhecidos. Considerando isto, nosso grupo decidiu caracterizar a atividade biológica do α -tocoferol em um modelo de peritonite aguda induzida pelo LPS em camundongos e a sua relação com o receptor nuclear PPAR γ . Neste trabalho, nós demonstramos pela primeira vez que o α -tocoferol apresenta atividade antagônica em um modelo inflamatório *IN VIVO*, e que a atividade antiinflamatória envolve a inibição da secreção da quimiocina KC murina, homóloga da IL-8 humana. Paralelamente, nós verificamos que a ativação do receptor nuclear PPAR γ exacerba a resposta no mesmo modelo, mostrando que esse receptor apresenta papel pró-inflamatório na resposta induzida pelo LPS *IN VIVO*. Além disso, o agonista de PPAR γ rosiglitazona aumenta a secreção de KC *in vitro*, mas tem sua atividade inibida pelo tratamento com α -tocoferol. Os ensaios de transfecção também mostraram que este tocoferol pode atuar inibindo a sinalização pelo PPAR γ . Nesse trabalho, demonstramos que o α -tocoferol é um importante agente antiinflamatório na resposta induzida pelo LPS e sua ação envolve a inibição do receptor nuclear PPAR γ .

ABSTRACT

Vitamin E, a generic term to describe a group of structurally lipophilic molecules (tocopherols and tocotrienols), is one of the most known antioxidants and it has been studied also because its non-antioxidant roles. By the way, depending on the administered dose, α -tocopherol can exert antagonistic effects *in vitro*. It's known that PPAR γ , a nuclear receptor involved in transcription of inflammatory genes, can be related to α -tocopherol effects. Considering this, our group decided to characterize the α -tocopherol activity in an mice peritoneal LPS-induced inflammation model and its possible relationship with PPAR γ receptor. In this work, we show for the first time that α -tocopherol can exert antagonistic effects in an *IN VIVO* inflammatory model and that anti-inflammatory activity involves KC secretion inhibition. In parallel, PPAR γ activation enhances the response in the same model, showing that this receptor exerts proinflammatory role in LPS-induced response *IN VIVO*. In addition, rosiglitazone, a PPAR γ agonist, upregulates KC secretion *in vitro*, but its activity is inhibited by α -tocopherol treatment. Transfection assays also show that α -tocopherol can act through PPAR γ signaling pathway. In conclusion, α -Tocopherol is an important antiinflammatory agent in LPS-induced response and its action involves down regulate of KC secretion by PPAR γ activity inhibition.

ÍNDICE

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A VITAMINA E	01
1.1.1. Estrutura química e fontes alimentares	01
1.1.2. Proteínas ligadoras, absorção intestinal e distribuição sistêmica e celular da vitamina E.	06
1.1.3. A atividade biológica das estruturas da vitamina E e os efeitos antagônicos da sua administração.	08
1.1.3.1. Potencial antiinflamatório	08
1.1.3.2. A questão antagônica: Potencial Pró-inflamatório?	08
1.1.3.3. Atividade biológica da vitamina E: mecanismos de ação	09
1.2. OS RECEPTORES NUCLEARES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMAS – PPARs	10
1.2.1. Os PPARs: histórico e funções fisiológicas	10
1.2.2. Modulação da atividade do PPAR γ	11
1.2.2.1. Fosforilação de proteínas	11
1.2.2.2. Os ligantes de PPAR γ : agonistas e antagonistas	12
1.3. O α -TOCOFEROL E O PPAR γ NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO LIPOSSACARÍDEO DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA.	15
1.3.1. O modelo de peritonite aguda induzida pelo LPS: relevância clínica e características.	15
1.3.2. O PPAR γ e o α -tocoferol: evidências na resposta inflamatória induzida pelo LPS.	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	20
3. MATERIAL E METODOS	21
3.1. MATERIAS	21
3.2. MÉTODOS	22
3.2.1. Experimentos <i>IN VIVO</i>	22
3.2.2. Experimentos <i>In vitro</i>	23
3.2.2.1. Transfecção	23

3.2.2.2.	Experimentos <i>in vitro</i> com macrófagos peritoneais de camundongos C57BL6	28
3.2.3.	DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	29
3.2.3.1.	Dosagem de leucotrieno B4 (LTB ₄)	29
3.2.3.2.	Dosagem de KC	29
3.3.	PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES DOS EXPERIMENTOS DESCRITOS	30
3.3.1.	Preparo do α -tocoferol, rosiglitazona e GW9662	30
3.3.2.	Preparo das soluções utilizadas	31
3.4.	ANALISE ESTATISTICA	
4.	RESULTADOS	
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA VITAMINA E: α -TOCOFEROL EXERCE EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO NA PERITONITE AGUDA INDUZIDA PELO LPS <i>IN VIVO</i> .	34
4.1.1.	α -Tocoferol pode inibir ou potencializar a migração de neutrófilos induzida pelo LPS <i>IN VIVO</i> .	34
4.1.2.	α -Tocoferol não altera os níveis de LTB ₄ na resposta inflamatória pelo LPS.	36
4.1.3.	A quimiocina CXC/KC está envolvida na inibição de neutrófilos pelo α -Tocoferol.	36
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ <i>IN VIVO</i> : PPAR γ EXERCE EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO NA PERITONITE AGUDA INDUZIDA PELO LPS.	38
4.2.1.	GW9662 inibe enquanto rosiglitazona potencializa a resposta inflamatória induzida pelo LPS.	38
4.3.	PPAR γ ESTÁ ENVOLVIDO NA AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DO α -TOCOFEROL	41
4.3.1.	α -tocoferol antagoniza os efeitos do agonista de PPAR γ rosiglitazona <i>in vitro</i>	41
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	44
6.	CONCLUSÃO	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8.	ANEXOS	62
8.1.	VASQUES, E; ALMEIDA, A.L.; NOYA, V.; D’ALEGRIA, B.;	

- MARATHE, G.; MCINTYRE, T.M.; TIBIRIÇA, E.; BOZZA, P.T.; SILVA, A.R.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Impairment of endothelium-dependent aorta relaxation by phospholipid components of oxidized low-density lipoprotein. *Endothelium*. 2006 Jan-Feb;13(1):1-8. 62
- 8.2. SILVA, A.R.; PACHECO, P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; D´ALEGRIA, B.; BANDEIRA-MELO, C.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1 regulated phenomenon. *Submetido*. 72
- 8.3. D´ALEGRIA, B.; CAMPBELL, C.; SOUZA, E.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; SILVA, A.R. Vitamin E exerts antagonistic activity *IN VIVO*: role of PPAR γ and keratinocyte-derived CXC/Chemokine in peritoneal-induced response. *Manuscrito em preparação*. 88

1. INTRODUÇÃO

1.1. A VITAMINA E

1.1.1. Estrutura química e fontes alimentares

O termo vitamina E foi introduzido em 1922 por Evans e Bishop para descrever um fator dietético importante para a reprodução animal. Em seus experimentos, a dupla de pesquisadores ofereceu acidentalmente uma dieta com gordura rancificada a um grupo de ratas. Após algum tempo, observaram que estas fêmeas apresentavam reabsorção fetal, não conseguindo assim gerar proles. Quando ofereceram vegetais frescos aos animais, a esterilidade pode ser revertida e os pesquisadores concluíram que um fator presente em plantas era essencial para a reprodução [1].

Em 1936, dois compostos diferentes, mas com a mesma atividade, que foi chamada *atividade de vitamina E*, foram extraídos do óleo de trigo [2]. A partir daí, a complexa natureza desta vitamina começou a ser elucidada e hoje se sabe que a vitamina E não é composta por um único fator, mas por um grupo de oito moléculas estruturalmente relacionadas [3].

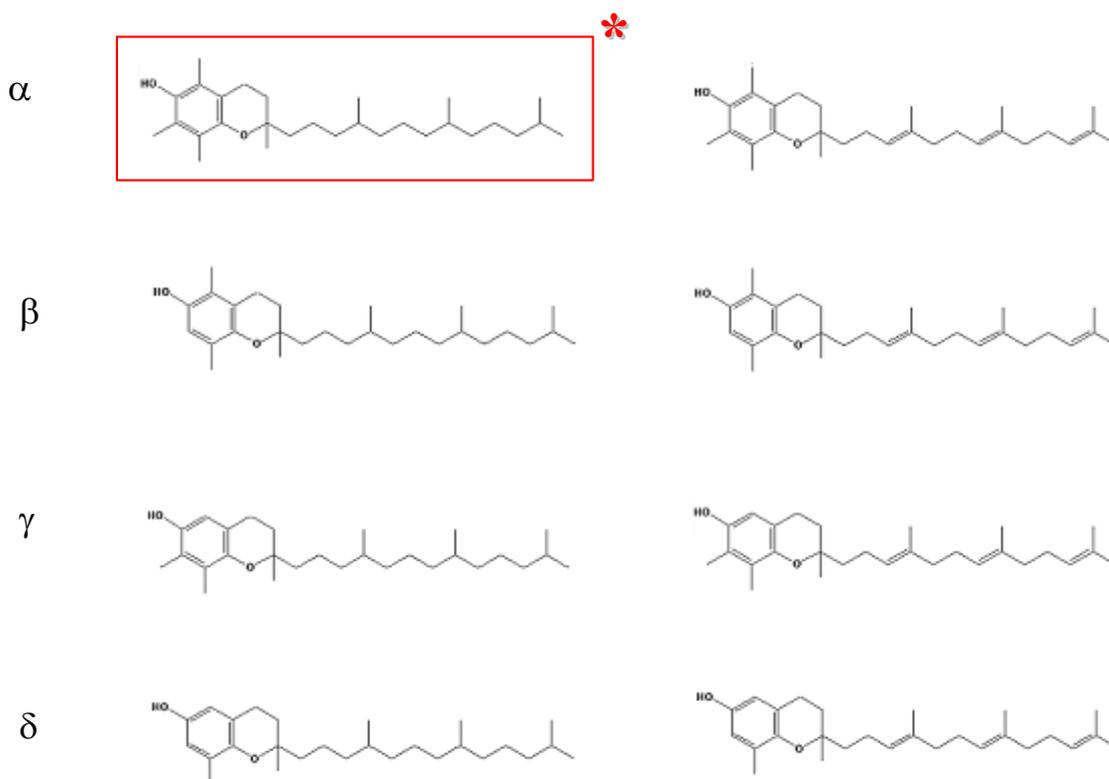
A estrutura molecular da vitamina E é baseada em um anel cromanol com uma cadeia lateral que se inicia no carbono 2 (C2). Dependendo do tipo de cadeia lateral, a vitamina E pode ser subdivida em dois grupos: os tocoferóis (saturada) e os tocotrienóis (insaturada). Atualmente, existem 4 tipos de tocoferóis e 4 tipos de tocotrienóis descritos.

O cromanol é uma estrutura derivada do naftaleno pela substituição de um átomo de carbono por um de oxigênio. No caso da vitamina E, o anel cromanol possui dois radicais invariáveis: um grupo OH no carbono 6 e um grupamento metil (CH₃) no carbono 8. Os hidrogênios do anel podem ainda ser substituídos por outros CH₃. Dependendo do número e da posição desses radicais em relação à hidroxila, as estruturas da vitamina E podem ser classificadas em α , β , δ ou γ .

O α -tocoferol e o α -tocotrienol possuem grupos metil nos carbonos 5, 7 e 8. O δ -tocoferol só possui o radical metil no carbono 8, enquanto que os β e γ -tocoferóis e tocotrienóis possuem estes grupos nas posições 5,8 e 7,8 respectivamente. Mais uma vez cabe lembrar que o grupamento CH₃ do carbono 8 é comum a todos sendo, como a hidroxila, constitutivo das estruturas de vitamina E.

Tocoferóis

Tocotrienóis



* Único fabricado artificialmente

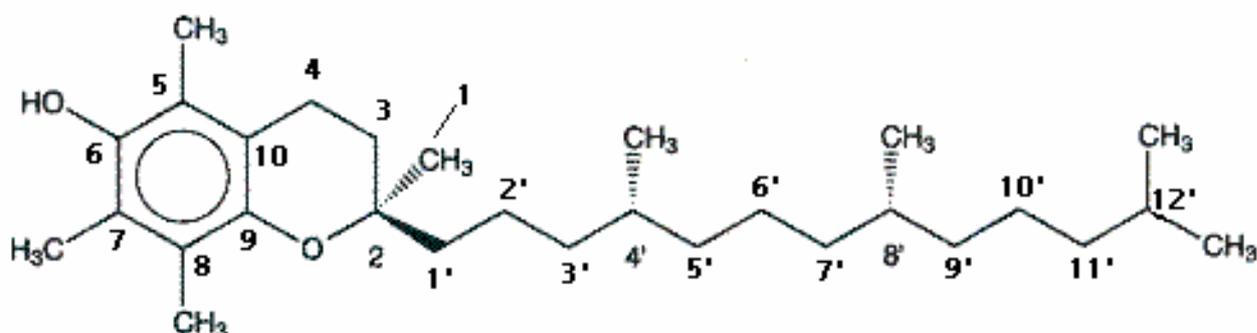
Figura 1.1 – Principais estruturas com atividade de vitamina E. As 8 moléculas de ocorrência natural que compõem o grupo da vitamina E. Todas apresentam estrutura química semelhante (anel cromanol + cadeia lateral) diferindo entre si na quantidade total de grupamentos metil (CH_3). São exceção o γ e o β -tocoferol, que possuem a mesma quantidade de CH_3 e em conseqüência disto, são isômeros de cadeia. Postula-se que todas essas moléculas possuam os mesmos efeitos fisiológicos, apresentando assim um mesmo tipo de atividade que foi chamada *atividade de vitamina E*. [4]

Os carbonos da cadeia lateral das estruturas de vitamina E são numerados diferentemente daqueles presentes no anel cromanol, como pode ser visto na figura 1.2. Nos tocoferóis, os carbonos 2 (presente no anel cromanol), 4' e 8' são assimétricos e por isso, apresentam isomeria óptica. Assim, cada tipo de tocoferol pode apresentar até oito isômeros ópticos, o que amplia o número de moléculas com atividade de vitamina E. No entanto, como a vitamina E é produzida por plantas, apenas isômeros dextrógiros (do tipo R,R,R,) são encontrados.

Uma exceção é o α -tocoferol. Este pode ser sintetizado artificialmente, o que possibilita a síntese dos seus oito estereoisômeros. A mistura racêmica originada é chamada all-rac- α -tocoferol (*all-rac- α -tocopherol*) ou DL-tocoferol e é comercializada para suplementação dietética. O isômero de ocorrência natural do α -tocoferol, e portanto dextrógiro, é conhecido como RRR- α -tocoferol ou D- α -tocoferol.

Neste trabalho, admitir-se-á o termo vitamina E e os nomes particulares de suas estruturas como sinônimos, para efeito de simplificação.

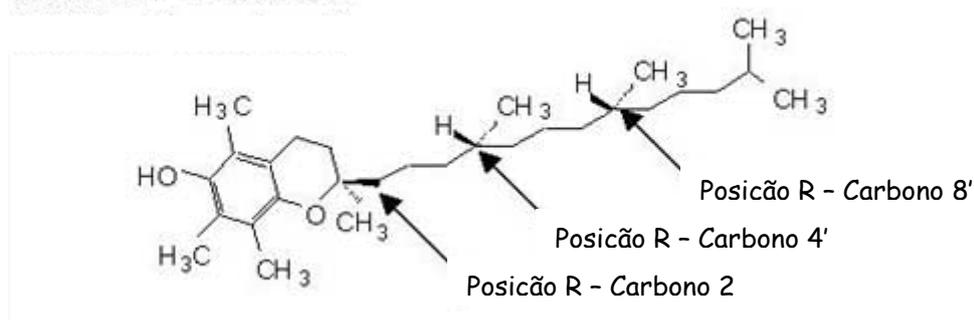
(a)



Cadeia carbônica do RRR- α -tocoferol: o anel cromanol recebe numeração diferente da cadeia lateral saturada.

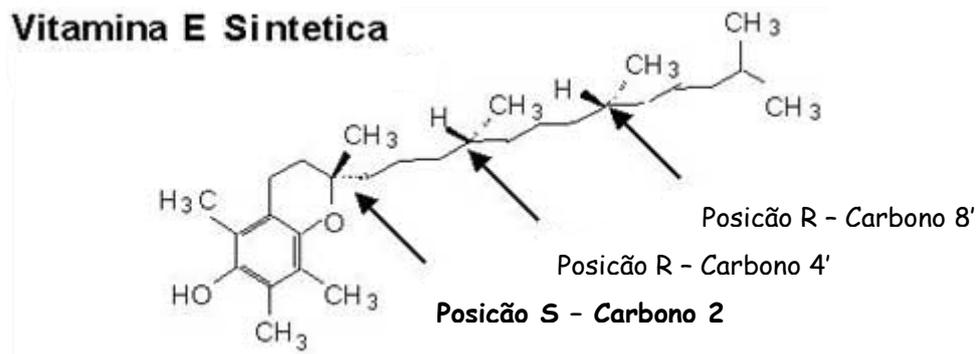
(b)

Vitamina E Natural



R refere-se ao carbono quiral que desvia a luz para a direita. Por isso, a estrutura acima é chamada RRR- α -tocoferol, o que significa que todos os carbonos desviam a luz polarizada para a direita. Esta é a única estrutura do α -tocoferol de ocorrência natural.

Vitamina E Sintética



Quando pelo menos um dos carbonos quirais desvia a luz polarizada para a esquerda, é chamado S. Desta forma, a estrutura acima é o SRR- α -tocoferol. Ainda, existem os isômeros SSR, SRS, SSS, RSR, RRS, RSS, assim como o RRR mostrado anteriormente. Os carbonos S só são possíveis artificialmente. O α -tocoferol produzido industrialmente é, portanto, uma mistura de todos esses isômeros em proporções iguais (12,5% de cada).

Figura 1.2 – Detalhes da cadeia carbônica das estruturas de vitamina E. (a) A numeração dos carbonos da vitamina E. Os carbonos do anel e da cadeia lateral possuem numerações distintas; enquanto os primeiros recebem uma numeração que vai de 1 a 10, os últimos são numerados de 1' a 12'. Modificado a partir de Jiang e colaboradores [5]. (b) A isomeria óptica do α -tocoferol. O carbono 2 do anel e os carbonos 4' e 8' (ambos da cadeia lateral) são assimétricos apresentando assim, isomeria óptica. O α -tocoferol é o único tocoferol fabricado artificialmente, sendo por isso o único que tem os 8 estereoisômeros disponíveis. Os demais (γ , β e δ) são comercializados a partir de extratos de óleos e por isso, estão disponíveis em uma única forma (RRR). Adaptado a partir de Traber & Leonard [6].

A vitamina E natural é sintetizada apenas por plantas e por isso é amplamente encontrada nos óleos vegetais. O óleo de trigo, por exemplo, além de ser a principal fonte de vitamina E, é também fonte do α -tocoferol (~1,3 g/kg). Já os óleos de milho e de soja são ricos em γ -tocoferol (~ 0,6 g/kg). Para maiores detalhes sobre as quantidades de tocoferóis nos óleos vegetais, ver tabela 1.1.1.

Tabela 1.1 – Quantidade de vitamina E em determinados alimentos¹.

Alimentos	Quantidade de α -tocoferol (mg/100g)	
	mg	IU ² (aprox.)
Óleo de trigo	133	198
Óleo de girassol	49	73
Óleo de algodão	39	58
Óleo de açafrão	38,7	57
Óleo de amendoim	13	19
Maionese	13	19
Margarina	14	21
Óleo de soja	10,1	15
Manteiga	2,2	3

Óleos	Quantidade total de vitamina E (mg/100g)				
	α	β	γ	δ	Total
Trigo	133,0	71	26,0	27,1	257,1
Soja	10,1	–	59,30	26,4	95,8
Açafrão	38,7	–	17,40	24,0	80,1
Milho	11,2	5	60,20	1,8	78,2
Algodão	39,0	–	38,70	–	77,7
Girassol	49,0	–	5,10	0,8	54,9
Amendoim	13,0	–	21,60	2,1	36,7

¹ Tabela criada a partir dos dados de Farrell & Roberts [7] e Azzi & Stocker [8]. É importante lembrar que o conteúdo de vitamina E varia nos alimentos em função do processamento industrial.

² Convencionou-se que o α -tocoferol é a estrutura de vitamina E com 100% de atividade biológica. Assim, 1 mg de α -tocoferol equivale a 1,49 UI. As demais estruturas (incluindo os tocotrienóis) têm sua atividade medida a partir da atividade do α -tocoferol sendo, portanto, uma atividade relativa. Desta forma: α -tocoferol: 100%; β -tocoferol: 40%; γ -tocoferol: 10-30%; δ -tocoferol: 1%, α -tocotrienol: 30%. Informações extraídas de Farrell & Roberts [7].

1.1.2. Proteínas ligadoras, absorção intestinal e distribuição sistêmica e celular da vitamina E.

Apesar de ter sido descoberta em 1922, somente na última década muitos estudos avançaram no sentido de entender a fisiologia da vitamina E. Justamente por isso, alguns aspectos que envolvem desde a absorção até a destruição deste micronutriente pelo fígado ainda não estão bem caracterizados.

Até o final da década de 90, acreditava-se que a absorção das moléculas de vitamina E ocorria somente por difusão passiva no duodeno [9]. No entanto, estudos recentes demonstraram que existem receptores nos enterócitos que são capazes de reconhecer esta vitamina e assim promover sua absorção intestinal. Entre esses receptores, destacam-se os do tipo ABC e também o receptor *scavenger* do tipo B1 (*scavenger receptor type B1*; SR-B1) [9, 10].

Um estudo realizado *in vitro* com células do tipo CACO-2 mostrou que o bloqueio do SR-B1 com anticorpos foi capaz de diminuir em até 70% a captação de tocoferol [11]. Ao ser absorvida, a vitamina E é carregada por quilomícrons até o fígado [12]. Lá, o α -tocoferol é preferencialmente incorporado nas lipoproteínas por uma enzima chamada proteína transferidora de α -tocoferol (*α -tocoferol transfer protein*; α -TTP). A α -TTP é específica para o RRR- α -tocoferol ([13, 14]. Por isso, a suplementação com o all-rac- α -tocoferol aumenta substancialmente apenas os níveis de RRR- α -tocoferol [12, 15]. A absorção intestinal de vitamina E, porém, acontece independente da isoforma presente na dieta [12].

Muito embora a absorção intestinal de vitamina E seja inespecífica para as suas diversas estruturas, a incorporação preferencial do α -tocoferol tem despertado o interesse de diversos pesquisadores em entender por que o organismo controla a quantidade plasmática especificamente deste tipo da vitamina.

Recentemente foi descrita uma outra proteína citosólica que se liga ao α -tocoferol. A proteína associada ao tocoferol (*tocopherol-associated protein*; TAP) é expressa em quantidades significativas no fígado, na próstata e no cérebro e supõe-se que ela seja responsável pelo tráfego intracelular do α -tocoferol. O seqüenciamento da TAP mostrou que esta proteína pode ser da família de proteínas que se ligam a moléculas hidrofóbicas, como a proteína ligante de fosfoinositol (*phosphatidylinositol-transfer protein*; SEC14) [16, 17]

Uma vez na circulação sanguínea, a vitamina E é captada pelas células de outros tecidos por meio dos receptores da lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*; LDL), o que sugere, a princípio, uma captação indireta [18]. No entanto, já foi descrita uma α -

TTP associada à membrana, o que garantiria então uma captação celular e um tráfego intracelular exclusivo para o α -tocoferol [19, 20]

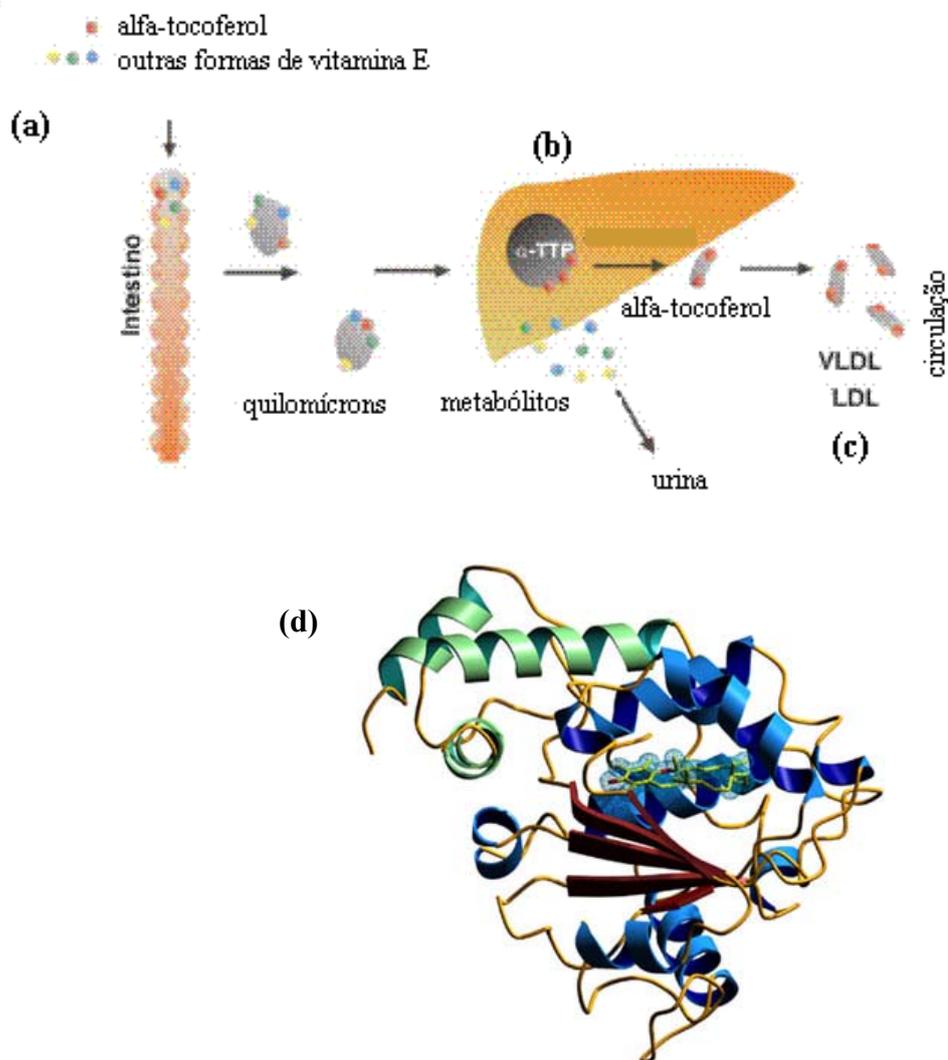


Figura 1.3 – Absorção intestinal e distribuição da vitamina E. (a) Independente da estrutura em questão, a vitamina E é absorvida no intestino delgado por meio de receptores SR-B1, ABC e uma pequena parte por difusão passiva. (b) É carregada até o fígado onde a enzima α -TTP incorpora o RRR- α -tocoferol às lipoproteínas. (c) Uma vez na corrente sanguínea, a vitamina E é carregada nestas lipoproteínas, em especial a LDL, e é captada pelas células juntamente com a mesma. (d) Estrutura da α -TTP humana. α -TTP vista por baixo da folha β . O α -tocoferol no sítio de ligação da proteína está representado em amarelo no centro da figura. As hélices com os domínios N-terminal estão indicadas em verde, as com domínios C-terminal em azul. Figuras adaptadas a partir de N. Landes [21] e Min e colaboradores [19].

1.1.3. A atividade biológica das estruturas da vitamina E e os efeitos antagônicos da sua administração.

1.1.3.1. Potencial antiinflamatório

Quanto à atividade biológica, é conhecida a atividade antioxidante da vitamina E. Chama atenção, porém, as chamadas “novas” funções desta vitamina, que são funções exclusivas e independentes da sua ação antioxidante.

Diversos estudos *in vitro* apontam para efeitos antiinflamatórios da vitamina E. A administração em doses farmacológicas das suas principais formas, o α e o γ -tocoferol, resulta em diminuição da proliferação das células musculares lisas [22], da adesão plaqueta-monócito [23], da agregação plaquetária [24], da secreção de mediadores inflamatórios [25-27] e inibição da proliferação de células cancerígenas [28].

Estudos em humanos também mostraram efeitos benéficos como diminuição da agregação plaquetária [29], sendo o mecanismo de ação dependente da inibição da proteína quinase C (*protein kinase C*; PKC) [24].

Especificamente com relação à resposta inflamatória *in vivo*, já foi demonstrado que a suplementação dietética de γ -tocoferol reduz a resposta inflamatória ao inibir a formação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e Prostaglandina E₂ (PGE₂). Estes resultados apontam que a administração de vitamina E seria mais efetiva que a aplicação de drogas não-esteróides antiinflamatórias, as NSAIDs (*Non-steroidal antiinflammatory drugs*; NSAIDs) [26].

Além disso, alguns estudos epidemiológicos também apontam uma relação inversa entre níveis séricos de tocoferóis, em especial o α -tocoferol, e a incidência de doenças cardiovasculares [30, 31] e câncer [32, 33]. Estes estudos mostram que a suplementação de α -tocoferol pode resultar em efeitos benéficos no que diz respeito à prevenção de doenças de caráter degenerativo.

1.1.3.2. A questão antagônica: Potencial Pró-inflamatório?

Na linha dos estudos em humanos, apesar dos resultados positivos relatados acima, muitos estudos epidemiológicos não encontraram resultados significativos na suplementação de vitamina E. Apesar desses estudos apresentarem falhas nas metodologias utilizadas, houve uma diminuição do interesse pela vitamina E após a publicação desses.

De forma interessante, foi publicada em 2004 uma meta-análise que reacendeu a polêmica acerca da suplementação de vitamina E [34]. Apontada até então como uma vitamina essencialmente antiinflamatória e cuja suplementação não poderia trazer problemas, este estudo mostrou que o grupo de indivíduos que faziam suplementação com doses acima de 400 UI/dia tiveram aumento da mortalidade. Até a publicação desta meta-análise, alguns poucos estudos experimentais já tinham evidenciado que a vitamina E poderia ter efeitos maléficos se administrada em altas concentrações [35-37]

Entre estes, um estudo *ex vivo* realizado em 1995 com aorta de coelhos demonstrou que quando o acetato de α -tocoferol foi administrado em baixas doses houve melhora da função vasodilatadora endotelial, enquanto que a administração de uma dose 10 vezes maior piorou essa função [35].

Estes efeitos, no entanto, não parecem ser devido à sua toxicidade, mas parecem potencializar alguma condição inflamatória já existente.

1.1.3.3. Atividade biológica da vitamina E: mecanismos de ação

Devido às contradições que cerceiam a suplementação de vitamina E, muito se discute sobre a sua verdadeira atividade biológica (pró ou antiinflamatória). Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de caracterizar os efeitos da utilização desta vitamina em doses farmacológicas. De igual forma, muitos mecanismos vêm sendo propostos para explicar a ocorrência desses efeitos tão díspares.

Um desses mecanismos inclui a relação com o receptor nuclear PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor type γ* , PPAR γ). Já foi demonstrado, por exemplo, que o γ -tocoferol aumenta a expressão deste receptor *in vitro* [3].

Outra evidência reside no fato de que o isômero RRR- α -tocoferol diminui a expressão do receptor *scavenger* CD36 [25, 38], por um mecanismo que não está relacionado com a inibição da PKC [25]. Sabe-se, no entanto, que a expressão do CD36 está diretamente relacionada à ativação do PPAR γ [39], levando a pensar se a diminuição da expressão do CD36 pelos tocoferóis estaria sendo mediada pelo PPAR γ .

As evidências mencionadas acima foram, no entanto, constatadas apenas em experimentos *in vitro*. O envolvimento do PPAR γ na atividade biológica da vitamina E *in vivo* não foi investigado até o presente momento.

1.2. OS RECEPTORES NUCLEARES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMAS – PPARs

1.2.1. Os PPARs: histórico e funções fisiológicas

Os receptores nucleares são membros de uma superfamília de fatores transcricionais que, após ativação por seus ligantes, modulam a transcrição de diferentes genes [40].

Esta superfamília inclui desde receptores para hormônios esteroidais, como estrogênio e glicocorticóides até os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, conhecidos como PPARs [40].

Os PPARs foram descritos em 1990 por seu papel central na proliferação de peroxissomos [41]. Atualmente, diversas outras funções têm sido atribuídas a esses receptores, tais como regulação do metabolismo de lipídios e lipoproteínas, controle de glicemia e participação nos processos inflamatórios [42]. Até o momento, foram identificados três subtipos de PPARs: α , β/δ e γ [43].

O PPAR α é expresso no fígado, músculo esquelético, tecido adiposo marrom, coração, vasos sanguíneos, monócitos/macrófagos, células de músculo liso e linfócitos [44]. Sua função envolve a regulação de genes envolvidos na degradação de lipídios por B-oxidação [45, 46].

O PPAR β/δ é globalmente expresso [47] e modula a oxidação de ácidos graxos em diversos tecidos [48] e na implantação da blástula [49]; porém, nenhuma das funções até agora descritas realmente indicam o papel sugerido pela ampla distribuição de sua expressão [47].

Já o PPAR γ é expresso no tecido adiposo marrom e branco, cólon, baço, vasos da retina, células endoteliais ([50, 51], linfócitos [52, 53], plaquetas e megacariócitos [54]. É também expresso em monócitos ativados e em macrófagos, incluindo células espumosas de lesões ateroscleróticas [55, 56]. Foi demonstrado que o PPAR γ é expresso em células dendríticas, alterando a maturação [57] e a produção de citocinas como IL-12 ([58].

Dentre os subtipos de PPARs, destaca-se o PPAR γ , cuja ativação está envolvida em uma série de processos inflamatórios [59].

1.2.2. Modulação da atividade do PPAR γ

1.2.2.1. Fosforilação de proteínas

O controle da atividade do PPAR γ (tanto ativação como inibição) pode ocorrer por meio da ligação deste receptor com os seus ligantes e também por modificações pós-transcricionais [60]. Para controlar a intensidade de um sinal gerado na ativação do PPAR γ , por exemplo, a célula utiliza mecanismos como a fosforilação [60]

A fosforilação pode aumentar ou diminuir a atividade desses receptores dependendo da proteína que os fosforila e do subtipo de PPAR que foi fosforilado [60]. De forma interessante, a fosforilação do PPAR γ pela MAP-quinase inibe a sua atividade *in vivo* [61]. E a ativação desse receptor inibe vias de sinalização que estão envolvidas na resposta inflamatória, como a do fator de transcrição NF- κ B [62-64].

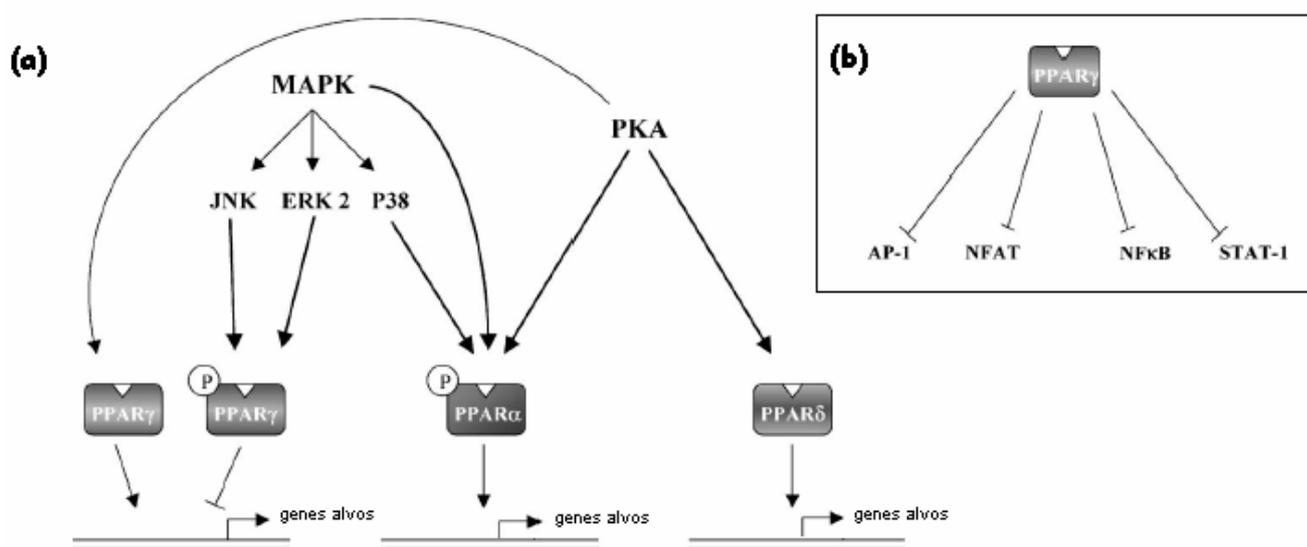


Figura 1.4 – Principais vias de sinalização envolvidas na regulação da atividade do PPAR γ . (a) Regulação da atividade dos PPARs pela fosforilação. Estes receptores são alvos para as quinases. A função da fosforilação dos PPARs parece ser específica da quinase envolvida e do isotipo de PPAR fosforilado. Por exemplo, a MAP-quinase quando fosforila o PPAR α aumenta a atividade do mesmo, enquanto que inibe o PPAR γ . (b) Os efeitos inibitórios do PPAR γ . Este isotipo pode bloquear a propagação do sinal gerado em vias de sinalização que envolvem o NF κ B, NFAT, AP-1 e STAT-1. Figuras adaptadas de Blanquart e colaboradores [60].

1.2.2.2. Os ligantes de PPAR γ : agonistas e antagonistas

Receptores são ativados por meio da ligação com moléculas capazes de desencadear um efeito, os agonistas. Diz-se que uma molécula é antagonista de um determinado receptor quando a mesma se liga a este sem gerar, no entanto, qualquer tipo de resposta [65].

Portanto, o controle da atividade do PPAR γ também ocorre por meio da sua ligação com seus agonistas ou antagonistas. De forma geral, quando a ligação com um agonista ocorre, alterações conformacionais ocorrem na molécula permitindo que este receptor dimerize com outro receptor nuclear: o receptor de ácido 9-cis-retinóico (*receptor X de retinóides*; RXR). O complexo PPAR γ -RXR migra para o núcleo e liga-se a região que responde ao PPAR γ , chamada PPRE (*PPAR γ Responsive Element*; PPRE), iniciando a transcrição gênica [44]. Ver figura 1.5.

Dentre os ligantes endógenos do PPAR γ , podemos destacar a 15-deoxi- Δ -^{2,14} prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) [66], o ácido lisofosfatídico [67] e hexadecil azeloil fosfatidilcolina (azPC) [68].

Em 1995, foi descrito que a 15d-PGJ₂ liga-se diretamente ao PPAR γ , promovendo a diferenciação de fibroblastos em adipócitos. Este estudo mostrou um novo mecanismo de ação para prostaglandinas da série J [69].

O ácido lisofosfatídico (*lysophosphatidic acid*, LPA) é um mediador lipídico formado e secretado em resposta a sinais fisiológicos. O controle da adipogênese pelo LPA pode ser mencionado como uma das diversas funções fisiológicas exercidas por esse lipídeo [70]. O LPA é produzido durante a ativação plaquetária [71] e é um agonista efetivo do receptor PPAR γ [67].

O azPC é um fosfolipídeo agonista de PPAR γ presente na LDL-oxidada humana (*oxidized low density lipoprotein*; LDL-ox) [68]. A atividade biológica da LDL-ox tem sido alvo de estudo do nosso grupo [72-74], que demonstrou inclusive que fosfolipídeos formados durante a oxidação desta lipoproteína, os C4-PAF, sinergizam com agonistas do PPAR γ na formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos [74]. Os C4-PAF são estruturalmente semelhantes ao fator de ativação plaquetária (*platelet-activated factor*, PAF) [75], mediador inflamatório importante na resposta inflamatória local induzida pelo LPS [76].

Entre os ligantes sintéticos, destacam-se os fármacos da família das tiazolidinedionas. A rosiglitazona é a principal representante desta classe, sendo usada clinicamente no controle glicêmico do diabetes mellitus [77]. As demais moléculas dessa (ciglitazona, troglitazona e

pioglitazona) ligam-se ao PPAR γ , porém com menor afinidade [78]. É importante ressaltar que há semelhança estrutural entre a troglitazona e o α -tocoferol, sendo o primeiro inclusive considerado uma estrutura análoga da vitamina E [79]. Para maiores detalhes sobre os ligantes de PPARs, ver a tabela 1.2. As estruturas de alguns ligantes de PPAR γ estão demonstradas na figura 1.5.

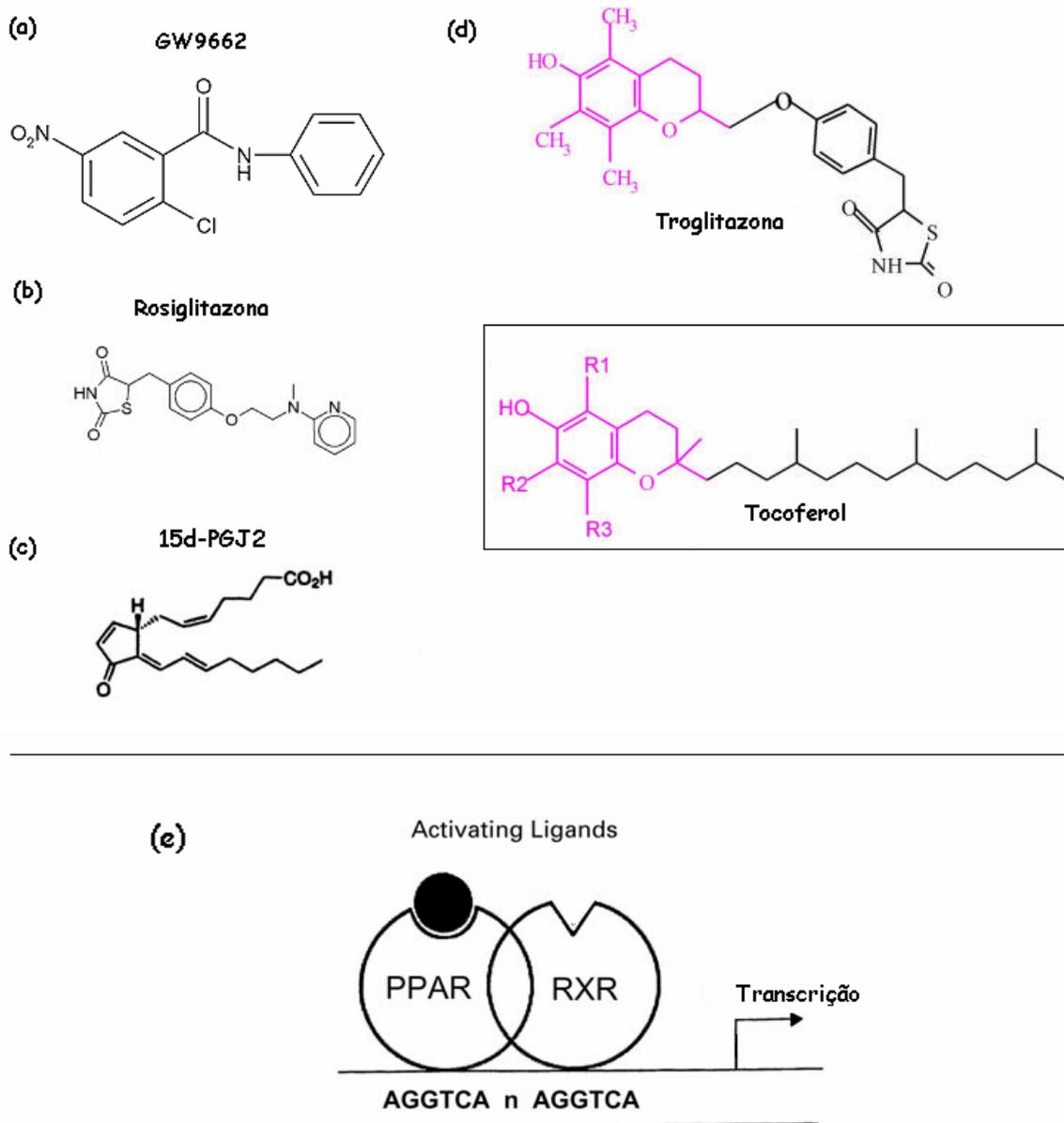


Figura 1.5 – Estrutura dos principais ligantes e transcrição gênica pelo PPAR γ . (a) o antagonista de PPAR γ GW9662 e os agonistas (b) rosiglitazona, (c) 15d-PGJ₂ e (d) Troglitazona. O detalhe mostra a estrutura do tocoferol, considerado análogo a troglitazona. Em (e), a transcrição gênica iniciada pela ativação do PPAR γ . Figuras modificadas a partir de Campbell e colaboradores e Y.S. Bakhle [3, 80, 81].

Tabela 1.2 – Principais ligantes dos PPARs¹.

Classe dos ligantes	PPARα	PPARβ	PPARγ
Sintéticos			
Agonistas	GW7647	GW501516	Rosiglitazona Troglitazona
Antagonistas	MK886		GW9662
Lipídeos ativadores			
Ácidos graxos	decahexanóico araquidônico linoléico	decahexanóico araquidônico linoléico	decahexanóico araquidônico
Fosfolipídeos			azPC
Eicosanóides			
	15d-PGJ ₂	15d-PGJ ₂	15d-PGJ ₂
	PGJ ₂	PGJ ₂	PGJ ₂
	12-HETE		15-HETE
	LTB ₄		

¹Modificado a partir de Moraes e colaboradores [44]

Diversos estudos têm descrito o envolvimento do PPAR γ em processos inflamatórios, como já mencionado anteriormente. Neste sentido, os ligantes deste receptor são utilizados como ferramentas investigativas. No entanto, embora a literatura seja consensual no que diz respeito à ativação do PPAR γ em modelos de asma, por exemplo, caracterizando-o como antiinflamatório, outros modelos de inflamação carecem de uma caracterização mais específica, como é o caso da resposta inflamatória induzida pelo lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa (*lipopolysaccharide*, LPS) e em outros modelos inflamatórios/infecciosos. Artigos recentemente publicados têm demonstrado resultados controversos no que diz respeito à ativação do PPAR γ na resposta ao LPS, como será demonstrado a seguir.

1.3. O α -TOCOFEROL E O PPAR γ NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA (LPS)

1.3.1. O modelo de peritonite aguda induzida pelo LPS: relevância clínica e características.

Bactérias são microorganismos unicelulares e procariontes que podem viver em simbiose com outros organismos ou causar-lhes danos, como no caso das infecções bacterianas. Felizmente, organismos superiores, como os mamíferos, possuem mecanismos capazes de defendê-los contra essas infecções. O sistema imune, ao reconhecer esses patógenos, promove uma série de eventos com o objetivo único de eliminar o agente agressor e restabelecer a homeostasia.

A inflamação é, portanto, um mecanismo de defesa do hospedeiro. No entanto, quando acontece uma resposta exagerada por parte do sistema imune, danos teciduais sérios podem ocorrer. Condições clínicas como a SIRS (*systemic inflammatory response syndrom*; SIRS ou resposta inflamatória sistêmica) e o choque séptico atingem milhares de pessoas no mundo inteiro e são condições que refletem uma ação tão intensa do sistema imune que o hospedeiro não é capaz de suportar.

O LPS é uma estrutura da parede celular bacteriana e é responsável pela viabilidade e crescimento desses microorganismos. Durante a morte ou proliferação desses patógenos, o LPS é exposto e reconhecido por células capazes de gerar uma resposta de defesa a essa estrutura [76].

Quanto à composição química, é formado por um polímero de açúcar, o polissacarídeo, e uma porção lipídica, chamada lipídeo A. O antígeno O, presente no lipídeo A, é a parte da estrutura que desencadeia a resposta do sistema imune [82] (ver figura 1.6).

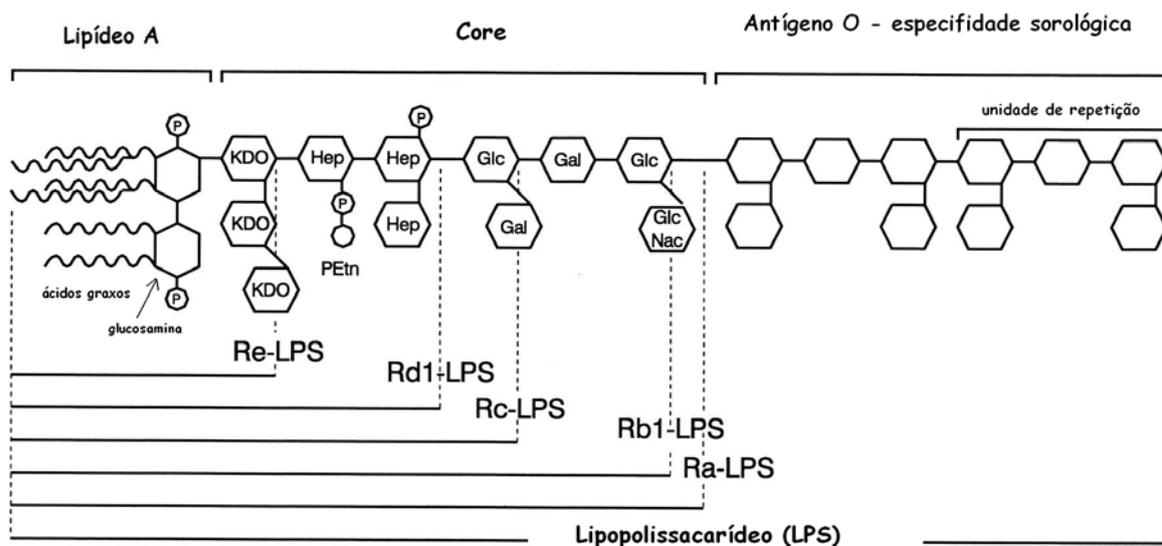


Figura 1.6 – Estrutura química da endotoxina de bactéria gram-negativa (LPS). O antígeno O é a porção responsável pela especificidade sorológica. Adaptado de Van Amersfoort e colaboradores [83].

De forma geral, o reconhecimento do LPS inicia-se com a ligação deste à proteína plasmática LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*; LBP) [84, 85]. Em seguida, o complexo LPS-LBP é reconhecido pelo receptor CD14. No entanto, como o CD14 não é capaz de iniciar sozinho uma sinalização intracelular [86], há o recrutamento do TLR-4 (*toll-like receptor*, traduzido como *receptor semelhante àquele de drosophila*; TLR) [83, 87]. A sinalização desencadeada pelo TLR-4 ativa fatores de transcrição e proteínas quinases importantes como o NFκB e as MAP-quinases (*mitogen-activated protein kinases* ou quinases protéicas ativadas por mitógenos), o que leva à transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória [83, 87].

A administração local de LPS resulta em duas fases de acúmulo leucocitário. O primeiro caracteriza-se por uma intensa migração de neutrófilos, que se inicia 1 hora após a administração da endotoxina e atinge o máximo entre 6-12 horas após mesma. Já o acúmulo posterior de eosinófilos é inicial a partir de 12 e máximo entre 24-48 horas [88].

Os macrófagos residentes são as células que reconhecem e iniciam a resposta inflamatória local ao LPS [83]. Comandam essa resposta imune por meio de uma série de receptores como o complexo maior de histocompatibilidade do tipo II (*Major Complex Histocompatibility*, MCHII), os receptores CD14, CD18 e os receptores do tipo *toll-like* [83]. Após 1h da administração de LPS, é possível detectar o fator de necrose tumoral (TNF-α), a interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) [89].

Uma vez secretados, os mediadores inflamatórios atuam nas células endoteliais. Em resposta ao TNF- α e IL-1, estas células aumentam a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ECAM-1 e E-selectinas [90, 91]. Com isso, há um aumento na adesão e na transmigração de leucócitos essenciais nessa resposta, como os neutrófilos e os eosinófilos.

Dentre os principais fatores quimiotáticos para neutrófilos, podemos destacar o LTB₄, a IL-8/KC e o fator de ativação plaquetária (*platelet-activating factor*; PAF).

O LTB₄ é inicialmente produzido pelo macrófago, sendo um fator quimiotático poderoso para os neutrófilos [92]. De forma resumida, o LTB₄ é sintetizado por meio da conversão do ácido araquidônico em leucotrieno A₄, sendo a enzima 5-lipoxigenase (*5-lipoxygenase*; 5-LO) essencial nesse processo [93]. Uma vez ativados e no sítio inflamatório, os neutrófilos passam a produzir LTB₄, amplificando a quimiotaxia iniciada pelo macrófago residente [94, 95].

A interleucina-8 é uma quimiocina do tipo CXC que possui atividade quimiotática para neutrófilos [96] e linfócitos T *in vitro* [97]. A IL-8 pode ser produzida por uma série de tipos celulares [96], entre eles, células endoteliais e hepatócitos [98, 99].

A produção de IL-8 não é constitutiva, sendo observada apenas após a utilização de estímulos como LPS, IL-1 e TNF- α [96]. Além dos seus efeitos quimiotáticos, a IL-8 é capaz de aumentar a adesão de neutrófilos a células epiteliais não estimuladas [100].

Após esses eventos iniciais, é a vez dos eosinófilos migrarem de forma significativa para o local inflamado. Esse acúmulo é máximo entre 24 e 48 horas e retorna aos níveis basais cerca de 120 horas após o desafio com LPS. Linfócitos T e macrófagos residentes são os principais tipos celulares envolvidos na migração de eosinófilos [76].

Todos esses fatores, associados à dilatação dos vasos e a diminuição do fluxo sanguíneo no local inflamado, são responsáveis pelos sinais clínicos da inflamação: dor, calor, rubor e edema.

O estudo acerca do LPS é de fundamental importância porque as principais situações observadas no choque séptico são em decorrência da resposta do sistema imune a essa molécula [83]. A resposta inflamatória induzida pelo LPS tem sido amplamente estudada, inclusive com contribuições importantes do nosso grupo, como será mostrado a seguir.

1.3.2. O PPAR γ e o α -tocoferol: evidências na resposta induzida pelo LPS

O papel dos agonistas de PPAR γ na resposta induzida pelo LPS ainda não se encontra bem esclarecido.

A 15d-PGJ₂, agonista endógeno do PPAR γ , inibe a secreção de IL-1 β , expressão de COX-2 e iNOS induzidos pelo LPS *in vitro* [101, 102]. De forma semelhante, foi demonstrado que o agonista sintético rosiglitazona inibe a secreção de TNF- α induzida pelo LPS *in vitro* [103, 104] sugerindo assim um papel antiinflamatório da ativação do PPAR γ . Recentemente, foi demonstrado que a administração exógena de ácido lisofosfatídico, outro agonista de PPAR γ , reduz a injúria orgânica causada pelo LPS *in vivo* [105].

Somam-se a estas evidências alguns estudos *in vivo* que mostram que a ativação do PPAR γ pode regular negativamente a via de sinalização que envolve o NF κ B *in vivo* (48-50). Esta via de sinalização está envolvida na resposta induzida pelo LPS, como já mencionado anteriormente. Embora essas evidências apontem para um papel antiinflamatório do PPAR γ , estudos *in vitro* mostraram que a 15d-PGJ₂ aumenta a secreção da quimiocina IL-8/KC [106-108], inclusive mostrando que este agonista atua de forma sinérgica com o LPS na expressão de RNA mensageiro para IL-8 [106].

Além disso, o azPC, agonista endógeno de PPAR γ presente na LDL-ox, também parece exercer papel pró-inflamatório, visto que é capaz de induzir a síntese de corpúsculos lipídicos em leucócitos *in vivo* [74].

Por isso, baseando-se na literatura, pode-se afirmar que os efeitos da ativação do PPAR γ na resposta inflamatória induzida pelo LPS é controversa.

Paralelamente, uma série de estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo o D- α -tocoferol e o LPS têm sido realizados com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico desta vitamina.

Já foi demonstrado que o α -tocoferol pode inibir a atividade da COX-2 em macrófagos murinos estimulados com LPS. Esta inibição independe da expressão de COX-2, sugerindo uma interferência pós-transcricional pelo α -tocoferol [109-111].

Em humanos, foi demonstrado que leucócitos de indivíduos suplementados com α -tocoferol durante 6 semanas (600 UI/dia) tiveram a secreção de IL-8 diminuída quando estas células foram estimuladas com LPS [112].

Recentemente, um estudo *in vitro* foi publicado mostrando que o succinato de α -tocoferol, um derivado da vitamina E, diminui a secreção de TNF- α e ativação de MAPK em células THP-1 estimuladas com LPS [113].

De forma interessante, camundongos geneticamente deficientes de α -TTP (*Ttpa*^{-/-} mice), a enzima que insere o α -tocoferol nas lipoproteínas, exibem uma deficiência importante de D- α -tocoferol no plasma e apresentam uma resposta inflamatória exacerbada quando desafiados com LPS. Isto sugere um importante papel para o D- α -tocoferol neste tipo de inflamação [114]. Cabe ressaltar que resultados pró-inflamatórios envolvendo o α -tocoferol e o LPS não foram descritos até o presente momento.

Pelo exposto, a ação da vitamina E e do receptor nuclear PPAR γ mostram resultados inconclusivos no que diz respeito às suas atividades na resposta inflamatória induzida pelo LPS, incluindo os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Desta forma, mais estudos envolvendo a caracterização dos efeitos tanto desta vitamina como deste receptor são necessários para desvendar o verdadeiro papel biológico dos mesmos na inflamação e os fatores que influenciam essa resposta.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Caracterizar a atividade da vitamina E na inflamação induzida pelo lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa;

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a atividade do D- α -tocoferol na resposta inflamatória *in vivo* induzida pelo LPS;
- Caracterizar a atividade do receptor nuclear PPAR γ também na resposta inflamatória *in vivo* induzida pelo LPS;
- Verificar se a modulação da atividade do PPAR γ pode ser um dos mecanismos de ação por meio do qual o α -tocoferol exerce a sua atividade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

O RRR- α -tocoferol (ou D- α -tocoferol) e o *Escherichia Coli* 127:B8 LPS foram obtidos da Sigma-aldrich Co. Os ligantes do receptor PPAR γ , o agonista Rosiglitazona e o antagonista GW9662, foram obtidos da Cayman Chemical.

Para a fixação e coloração dos esfregaços sanguíneos e citoesfregaços foram utilizadas as soluções de May-Grünwald e Giemsa, ambos da Merck.

Para a síntese dos plasmídeos utilizados, foram utilizadas bactérias *E. coli* quimicamente competentes e os meios de cultura relacionados da Invitrogen (*One Shot @TOP10 Chemically Competent*, Invitrogen; Meio S.O.C. *medium*, Invitrogen; Agar LB - *imMedia™ Amp Agar*, Invitrogen; Meio LB líquido - *imMedia™ Amp Liquid*, Invitrogen). Para a extração e purificação do DNA plasmídeo, foi utilizado o Kit de plasmídeos da QIAGEN (*QIAGEN® Plasmid Maxi Kit*).

Para os experimentos de transfecção, foram utilizados o meio OPTI-MEM da Gibco (*OPTI-MEM® Gibco*), tampão de lise da Promega (*Reporter lysis buffer, Promega*) e o kit para ensaio da luciferase da PROMEGA (*Luciferase Assay, Promega*). A lipofectamina e o plus, utilizados respectivamente para a formação de lipossomos e aumentar o tempo da transfecção também eram da Invitrogen.

As células RAW264,7 foram mantidas em garrafas do tipo TPP. Para os ensaios de transfecção e de cultura de macrófagos peritoneais, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços também do tipo TPP. Para as dosagens de ELISA e EIA foram utilizadas placas de 96 poços da NuncTM. O Kit utilizado para a dosagem de LTB₄ foi utilizado o kit de ensaio imunoenzimático monoclonal (placa revestida com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo, Cayman Chemical), enquanto que para a dosagem de KC foi utilizado o kit específico desta quimiocina da R&D systems.

Os demais reagentes utilizados foram obtidos da sigma ou da Merck, a saber: Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich); NaCl (Merck); KH₂PO₄ (Sigma Aldrich); KCl (Merck); MgCl₂ (Merck); β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich); ONPG (Sigma Aldrich); Tween® 20 (Sigma Aldrich).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Camundongos Swiss ou C57BL6 oriundos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz receberam como pré-tratamento uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de D- α -tocoferol (40 ou 120 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) ou Rosiglitazona (0,250 mg/Kg) ou GW9662 (0,500 mg/Kg) 30 minutos antes da injeção também i.p. de LPS (500 ng/cavidade). Os grupos controle foram tratados com uma única injeção de etanol ou DMSO, simulando o tratamento com o tocoferol e os ligantes de PPAR γ , com o objetivo para descartar os efeitos do veículo.

Seis horas após o estímulo, foram coletadas amostras de sangue periférico das veias caudais dos camundongos para a confecção de esfregaços e para análise da contagem total de leucócitos. Em seguida, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com 3 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*; PBS) [1x] não-estéril. Foram colocados 100 μL de cada lavado na citocentrífuga (450 rpm, 5 minutos) para confecção dos citoesfregaços. Os esfregaços sangüíneos e os citoesfregaços foram fixados por 15 minutos na solução de May-Grünwald e corados por 45 minutos na solução Giemsa, sendo posteriormente observados ao microscópio óptico para contagem diferencial de leucócitos. As amostras de lavado peritoneal e sangue periférico foram diluídas (1:20 e 1:80 respectivamente) em líquido de Turk para contagem total de leucócitos na Câmara de Neubauer. Para obtenção dos sobrenadantes, os lavados peritoneais foram centrifugados a 500 x g durante 10 min.

Os procedimentos experimentais encontram-se aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FIOCRUZ (CEUA), protocolo n^o p017/02.

3.2.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.2.2.1. Transfecção

Transformação de bactérias Escherichia coli (E. coli) quimicamente competentes

Bactérias *E. coli* foram descongeladas e incubadas com 10 picogramas do plasmídeo de interesse (SV40- β -galactosidase ou PPAR γ contendo o gene de resistência a ampicilina ou CD36⁻²⁷³-luciferase repórter, que contém a região responsiva ao PPAR γ , PPRE). O plasmídeo SV40- β -galactosidase foi obtido da Promega. O PPAR γ [115] foi obtido por meio da triagem de uma biblioteca de cDNA (Cayman Chemicals). Os clones foram sequenciados e subclonados no pcDNA1/Amp (Invitrogen). O CD36 repórter foi amplificado a partir de DNA de placenta humana por PCR e clonado no vetor pGL-3 (Promega) [56]. Para visualização dos plasmídeos, ver figura 3.1.

Em seguida, as *E. coli* foram submetidas a um choque térmico por 30 segundos no banho-maria a 42°C e foram incubadas com meio S.O.C. por 1h no agitador (Labline) a 37°C e 225 rpm. Após este período, as bactérias foram plaqueadas em meio agar Luria Bertani (LB) contendo ampicilina, com o objetivo de selecionar apenas os microorganismos transformados. As bactérias foram mais uma vez incubadas por um período de 12 a 16 horas em estufa bacteriológica a uma temperatura igual a 37°C. Uma colônia bacteriana transformada foi selecionada na placa e transferida para um tubo contendo 3mL de meio LB líquido contendo ampicilina, sendo depois incubada no agitador a 37°C e 300 rpm por cerca de 4 horas. Posteriormente, a cultura foi transferida para um novo tubo contendo 250 mL de meio LB líquido com ampicilina e mais uma vez incubada no agitador por cerca de 16 horas para expansão.

Isolamento e purificação de DNA plasmideal

A cultura expandida de bactérias transformadas foi centrifugada a 6.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 10 mL de tampão P1. Foram adicionados 10 mL de tampão P2 à suspensão para lisar as células. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados ao lisado 10 mL de tampão P3 resfriado para reajustar o pH da solução. O frasco foi gentilmente invertido algumas vezes e incubado por 20 minutos no gelo. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 30

minutos. O sobrenadante contendo o DNA plasmideal foi recolhido e novamente centrifugado nas mesmas condições por 15 minutos.

A coluna para purificação do DNA plasmideal foi equilibrada com 10 mL de tampão QBT e o sobrenadante resultante da última centrifugação foi aplicado na mesma. Após todo o líquido atravessar a resina por gravidade, a coluna foi lavada 2x com 30 mL de tampão QC para eliminar possíveis contaminantes na amostra. O DNA plasmideal foi então eluído da coluna com 15 mL de tampão QF, sendo posteriormente precipitado com 10,5 ml de isopropanol. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 15.000 x g por 30 minutos e o pellet foi ressuspensão em 5 mL de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada a 15.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Após secar ao ar, o pellet foi gentilmente ressuspensão em 1 mL de água MilliQ.

A concentração de DNA plasmideal na amostra foi determinada por meio da leitura no espectrofotômetro a 260 nm (densidade óptica do DNA plasmideal [50µg/ mL] = 1). Também se procedeu a leitura da amostra a 280 nm para verificar o grau de contaminação protéica na mesma. Valores próximos a 1,8 para a razão 260/280 nm são indicativos de alta eficácia durante o procedimento de purificação da amostra.

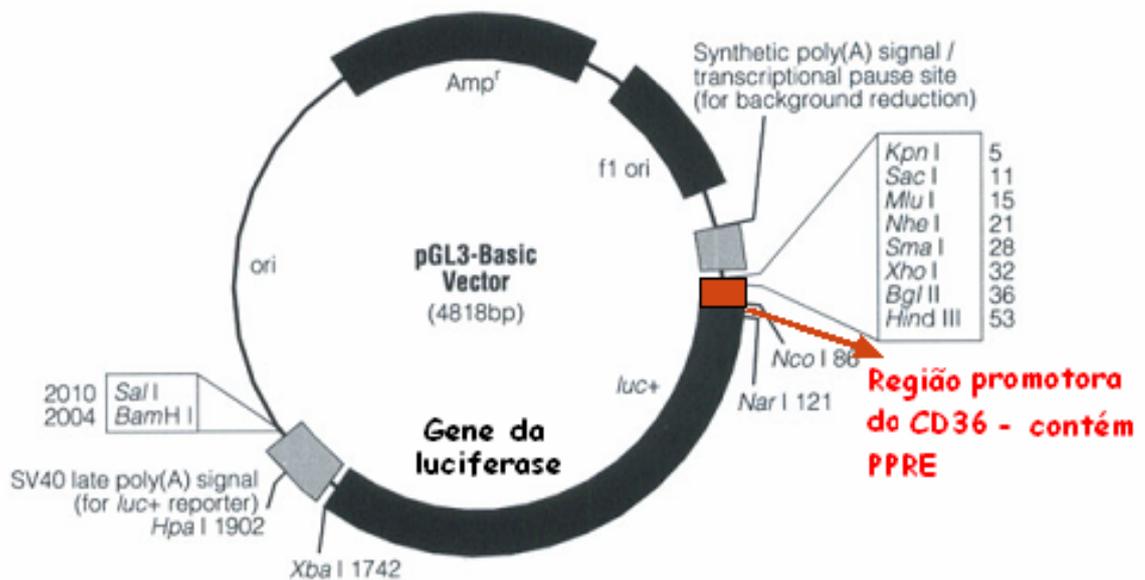
Descongelamento e manutenção de células RAW 264,7 para ensaios de transfecção

Os criotubos contendo as células RAW 264,7 foram retirados do nitrogênio líquido e incubados imediatamente à 37°C. Após o descongelamento total da amostra, as células foram rapidamente transferidas para um tubo contendo 5 mL de meio DMEM *HighGlucose* com 10% de soro fetal bovino e Penicilina 250U/mL/ Estreptomicina 250µg/mL. A suspensão celular foi centrifugada a 500 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 2 mL de meio. As células foram quantificadas e tiveram sua viabilidade determinada por exclusão do corante. Foram plaqueadas cerca de 2×10^5 células viáveis em uma garrafa pequena T-25 com um volume final de 5 mL de meio.

A cultura foi crescida na estufa a 37°C com 5% de CO₂ até sua confluência. Para realização da primeira passagem, a monocamada foi lavada 3x com 3 mL de PBS [1x] estéril e as células foram soltas mecanicamente da garrafa com o auxílio de um raspador. A suspensão celular foi transferida para um tubo e centrifugada a 500 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em PBS [1x] estéril. Mais uma vez, as células foram quantificadas e tiveram sua viabilidade determinada por exclusão do corante. Cerca de 10^6 células viáveis foram plaqueadas em uma garrafa média T-75 com um volume final de 10 mL de meio e incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o

estabelecimento da cultura, a mesma foi mantida através de passagens semanais utilizando a diluição recomendada pela ATCC de 1:4.

Plasmídeo repórter: PPRE-CD36 acoplado ao gene da luciferase



VETORES

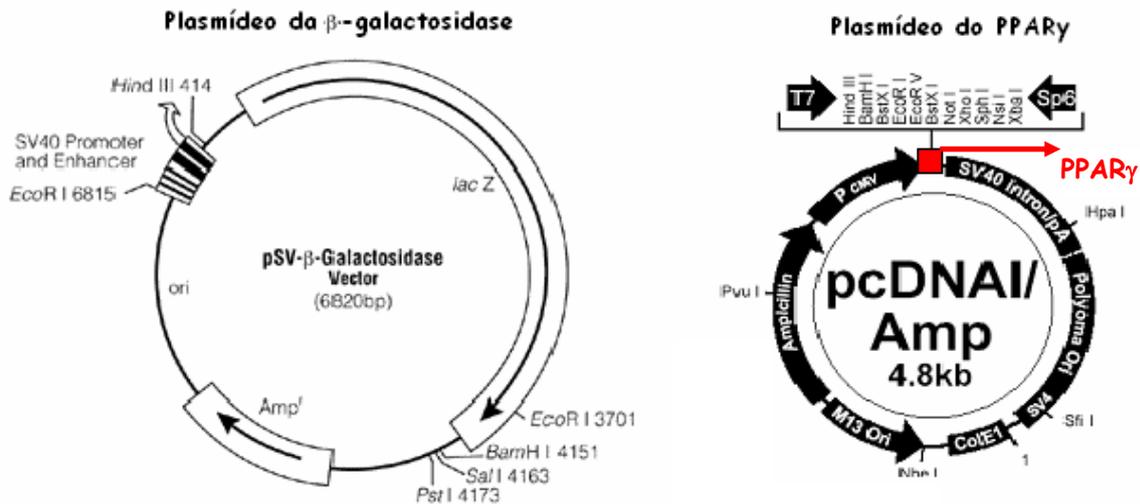


Figura 3.1 – Desenho dos plasmídeos utilizados nos experimentos de transfecção. Figuras extraídas ou modificadas a partir de http://www.promega.com/guides/transfxn_guide/transfxn.pdf

Transfecção e estimulação das células RAW 264,7

Cerca de 300.000 células da linhagem RAW 264,7 foram plaqueadas em cada poço da placa de cultura de 6 poços a ser transfectada. Vinte e quatro horas depois, cada poço da placa foi lavado 2x com 1 mL de PBS [1x] estéril e a solução de transfecção foi preparada. Cada poço recebeu 1mL da solução de transfecção e a placa foi submetida à incubação na estufa (37°C com 5% de CO₂) por 3h. Após o período de incubação, a solução de transfecção foi descartada e as células foram novamente lavadas com PBS [1x] estéril. O estímulo e o tratamento (respectivamente o agonista de PPAR γ Rosiglitazona, 1 μ M e o D- α -tocoferol, 100 μ M) foram diluídos em um volume final de 1 mL de meio em cada poço (meio DMEM *HighGlucose* 2 % SFB com penicilina e estreptomicina) nas concentrações de 100 μ M e 1 μ M, respectivamente. O esquema explicando o procedimento da transfecção pode ser observado na figura 3.2. A expressão do gene repórter é vista na figura 3.3.

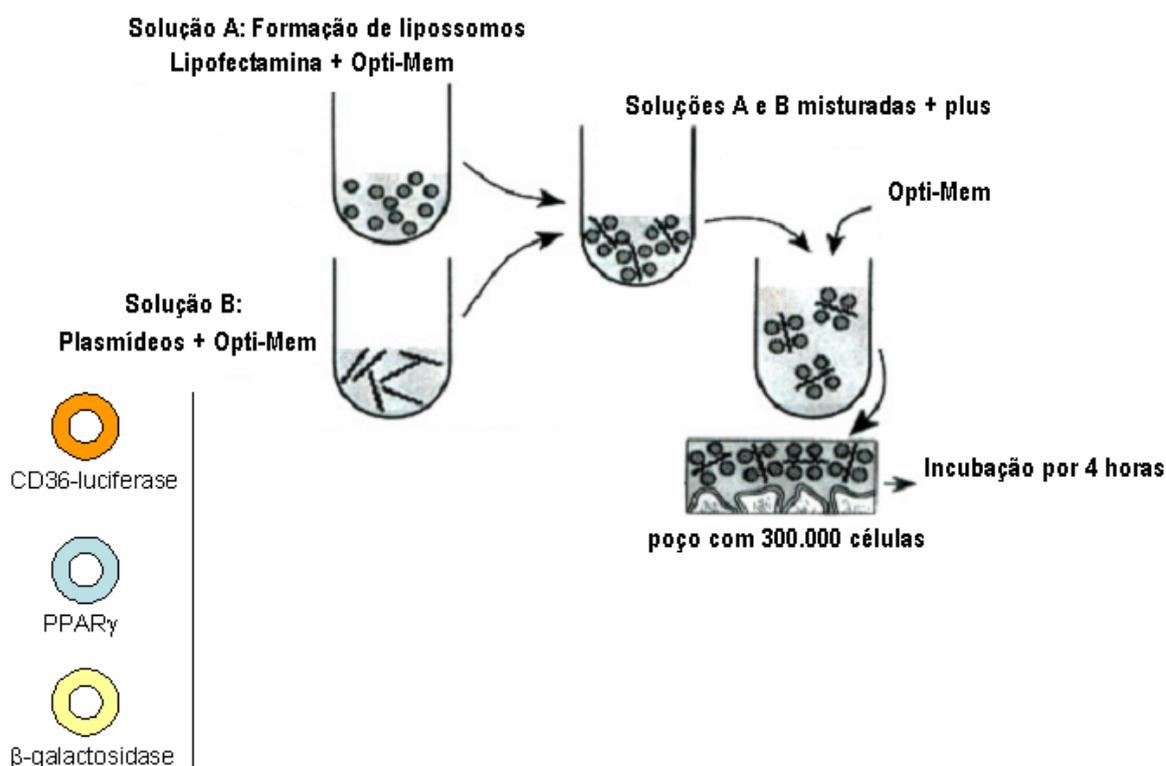


Figura 3.2 – Ensaio da transfecção. Os plasmídeos são misturados a lipofectamina para a formação dos lipossomos contendo o DNA. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, a mistura é adicionada às células e retirada 4 horas de incubação.

Lise das células e Ensaio de Luciferase

As células foram lisadas com 80 μL de *Reporter Lysis Buffer* e deslocadas do poço com a ajuda do raspador. 20 μL do lisado celular foram adicionados a 100 μL de Reagente para o Ensaio de Luciferase para a leitura. O luminômetro foi calibrado para um tempo de espera de 10 segundos e em seguida realizou-se a leitura das amostras.

Ensaio de β -Galactosidase

Preparou-se o tampão para o ensaio de β -galactosidase e adicionou-se 100 μL do mesmo a 20 μL de lisado em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi incubada na estufa a 37°C por três horas e a leitura das amostras foi realizada a 405 nm. As unidades relativas de luciferase foram obtidas através da razão entre as unidades de luciferase e as unidades de β -galactosidase.

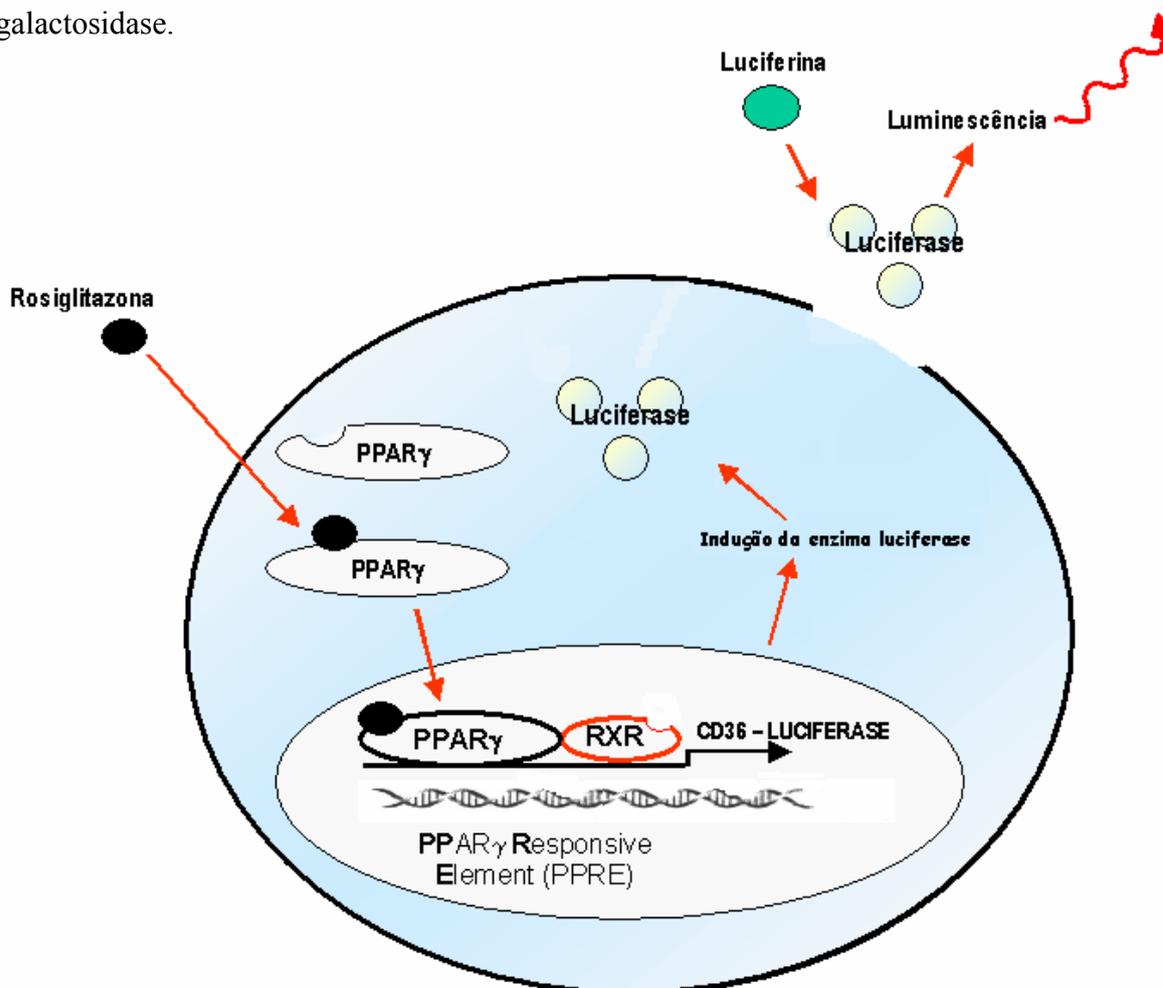


Figura 3.3 – A transfecção com o gene repórter CD36-luciferase – O gene repórter contém a seqüência de DNA responsiva ao PPAR γ (PPRE) seguido das seqüências do receptor *scavenger* CD36 e da enzima luciferase. A inibição ou ativação do PPAR γ altera os níveis de CD36 e luciferase na célula, captados indiretamente pela luminescência.

3.2.2.2. Experimentos *in vitro* com macrófagos peritoneais de camundongo C57BL6

Camundongos C57BL6 oriundos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram sua cavidade peritoneal lavada com 3mL de PBS [1x] estéril. Uma alíquota deste lavado foi diluída em líquido de Turk (40x) e quantificada na câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 10⁶ células por poço e as placas de cultura de 6 poços foram incubadas por 3 horas na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células não aderidas foram removidas por meio da lavagem das placas 2x com 1mL de PBS [1x] estéril e as células restantes foram estimuladas com Rosiglitazona (5µM) e tratadas com D-α-tocoferol (25 µM) por 6h. O sobrenadante foi recolhido para análise do mediador inflamatório KC.

3.2.3. DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

3.2.3.1. Dosagem de leucotrieno B₄ (LTB₄)

Para a dosagem do mediador lipídico LTB₄ foi utilizado o Ensaio Imunoenzimático. Neste, a intensidade da cor obtida é inversamente proporcional a quantidade do mediador mensurado. Este ensaio é baseado na competição entre o eicosanóide e o seu conjugado com acetilcolinesterase (AChE), também conhecido como rastreador. Como a concentração de rastreador é conhecida (e a concentração do LTB₄ nas amostras varia), a quantidade de rastreador capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal será inversamente proporcional à concentração de eicosanóide nos poços analisados.

A curva padrão e as amostras foram preparadas em tampão próprio para EIA de acordo com as especificações do kit utilizado. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com tampão de lavagem próprio do kit utilizado. 200µL do Reagente de Ellman's foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada no escuro por cerca de uma hora e a leitura dos poços foi feita em uma leitora de placas a 405 nm.

3.2.3.2. Dosagem de KC

A quimiocina KC foi mensurada por meio do ensaio de ELISA. Placas de fundo chato foram cobertas com o anticorpo de captura na concentração (1µg/mL). Vinte e quatro horas após a incubação (overnight, 4°C), as placas foram lavadas com solução de lavagem (*Wash Buffer* – PBS/Tween 0,05%) e incubadas durante 1 hora com a solução de bloqueio a temperatura ambiente (*Blocking Buffer* – PBS/BSA 1%). A curva padrão (200 pg/mL) e as amostras foram diluídas e plaqueadas em solução de bloqueio com tween a 0,05% (*Blocking Buffer/ Tween® 20*), sendo mais uma vez incubada por 24 horas (4°C). No 3°. dia, após a lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo de detecção (200 ng/mL) também diluído em *Blocking Buffer/Tween*. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se avidina-peroxidase (diluição 1:200, 30 min a temperatura ambiente) e solução de OPD. A leitura foi feita a 405 nm.

3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES DOS EXPERIMENTOS DESCRITOS

3.3.1. PREPARO DO D- α -TOCOFEROL, ROSIGLITAZONA, GW9662

Para os experimentos *in vivo*, alíquotas estoque de D- α -tocoferol foram preparadas em etanol (100 mM) e estocadas a -70°C . Para o controle da oxidação da vitamina E, as alíquotas estoque foram testadas antes do uso por meio da análise espectrofotométrica. Para o preparo das soluções, a alíquota estoque foi diluída em salina (concentração final de etanol 0,45%) e sonicada durante 10 min à 37°C . Para os experimentos *in vitro*, o α -tocoferol foi diluído em etanol (500 mM) e em seguida novamente diluído em soro fetal bovino (1:9). A alíquota com SFB foi sonicada por 10 minutos, a 37°C (concentração final de etanol 0,1% e de soro, 10%).

Paralelamente, foram preparadas soluções com 0,45% de etanol e as mesmas foram administradas aos grupos controle e estimulado com LPS para descartar os possíveis efeitos do etanol no fenômeno observado. O mesmo procedimento foi realizado nos experimentos *in vitro*.

Os ligantes de PPAR γ Rosiglitazona e GW 9662 foram diluídos em DMSO, e armazenados a -20°C . As soluções de uso tiveram uma concentração final de DMSO de 0,1%.

3.3.2. PREPARO DAS DEMAIS SOLUÇÕES UTILIZADAS

- *Phosphate-buffered saline* ou PBS 10x:

Componente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	1,6g
NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
KCl	2g
Água MilliQ	q.s.p. 1L

Para o uso, esta solução foi diluída 10x em água MilliQ, dando origem ao PBS [1x]. Para as soluções estéreis, o PBS [1x] não estéril foi filtrado em filtros previamente autoclavados e com o auxílio de uma bomba de vácuo dentro do fluxo laminar.

- PBS/Tween (*Wash Buffer*):

Componente	Quantidade
PBS [1x]	1 L
Tween ®20	0,5 mL

- PBS/BSA 1% (Solução de Bloqueio ou *Blocking Buffer*)

Componente	Quantidade
PBS [1x]	200 mL
Albumina Bovina	250 µl

- PBS/BSA Tween (Solução de Bloqueio Tween ou *Blocking Buffer Tween*)

Componente	Quantidade
PBS/BSA 1%	1L
Tween 20	0,5 mL

- Solução de Transfecção:

A solução de transfecção foi preparada no momento do uso a partir da mistura de duas soluções, A e B:

Solução A:

600 μ L de OPTI-MEM®
 6 μ g de plasmídeo CD36-luciferase/ PPRE
 1,5 μ g de plasmídeo PPAR
 0,6 μ g de plasmídeo β -galactosidase

Solução B:

600 μ L de OPTI-MEM®
 60 μ L de Lipofectamina®

As soluções A e B são misturadas e após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, 60 μ L do plus® é acrescentado para aumentar a eficiência da transfecção.

- Tampão para Ensaio de β -galactosidase:

O tampão para ensaio de β -galactosidase é composto por uma solução tamponada por fosfato de sódio acrescida de cloreto de magnésio, B-mercaptoetanol e O-Nitrofenil B-D-Galactopiranosídeo (ONPG). Uma vez hidrolisado, o substrato para a B-Galactosidase ONPG produz uma cor amarela, possibilitando a análise da expressão da enzima B-Galactosidase através da espectrofotometria.

A solução tamponada por fosfato de sódio (200mM) é preparada a partir de duas soluções:

Solução:

NaH₂PO₄ (200mM):

NaH₂PO₄ (Sigma Aldrich) 5,52g

Água MilliQ (Millipore) q.s.p. 200mL

Na₂HPO₄ (200mM):

Na₂HPO₄(Sigma Aldrich) 5,68g

Água MilliQ (Millipore) q.s.p. 200mL

Deve-se adicionar aos 200 mL de solução de Na₂HPO₄ (200mM) uma quantidade suficiente de solução de NaH₂PO₄(200mM) até que a solução tamponada por fosfato de sódio

passa a ter 2mM deste sal. Adicionar também B-mercaptoetanol suficiente para alcançar uma concentração de 100 mM.

O ONPG deve ser adicionado somente no momento do uso. Sua concentração final deve ser de 0,7 mg/mL.

- Líquido de Turk

Componente	Quantidade
Ácido acético glacial P.A.	20,0 g
Cristal Violeta	50,0 mg
H ₂ O	qsp 1L

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Student-Neuman-Keuls. Foram considerados significativos valores inferiores a 0,05 ($p < 0,05$). Os dados apresentados na seção a seguir estão representados como média \pm erro padrão (EPM).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA VITAMINA E: D- α -TOCOFEROL EXERCE EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO NA PERITONITE AGUDA INDUZIDA PELO LPS *IN VIVO*.

4.1.1. α -Tocoferol pode inibir ou potencializar a migração de neutrófilos induzida pelo LPS *in vivo*.

O RRR ou D- α -tocoferol é a forma de vitamina E mais abundante do plasma humano porque é preferencialmente incorporado nas lipoproteínas humanas [116].

Alguns estudos já demonstraram que esta isoforma possui atividade em processos inflamatórios [25, 26, 117, 118]. De forma interessante, somente três estudos, todos *in vitro*, demonstraram que o D- α -tocoferol pode apresentar efeitos antagônicos em um mesmo modelo experimental [35-37].

Para caracterizar então a atividade da vitamina E, camundongos C57BL6 foram tratados com uma única injeção intraperitoneal de D- α -tocoferol (40 μ g/cavidade ou 120 μ g/cavidade) 30 minutos antes do estímulo com LPS *in situ* (500 ng/cavidade).

Nossos resultados indicam que a vitamina E modula a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, exercendo papel anti ou pró-inflamatório dependendo da dose utilizada. Na menor dose (40 μ g/cavidade), o α -tocoferol inibiu o acúmulo neutrofílico enquanto que a maior dose (120 μ g/cavidade) potencializou este acúmulo. Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que o D- α -tocoferol é também capaz de apresentar efeitos antagônicos em um modelo experimental *in vivo* e na resposta inflamatória induzida pelo LPS.

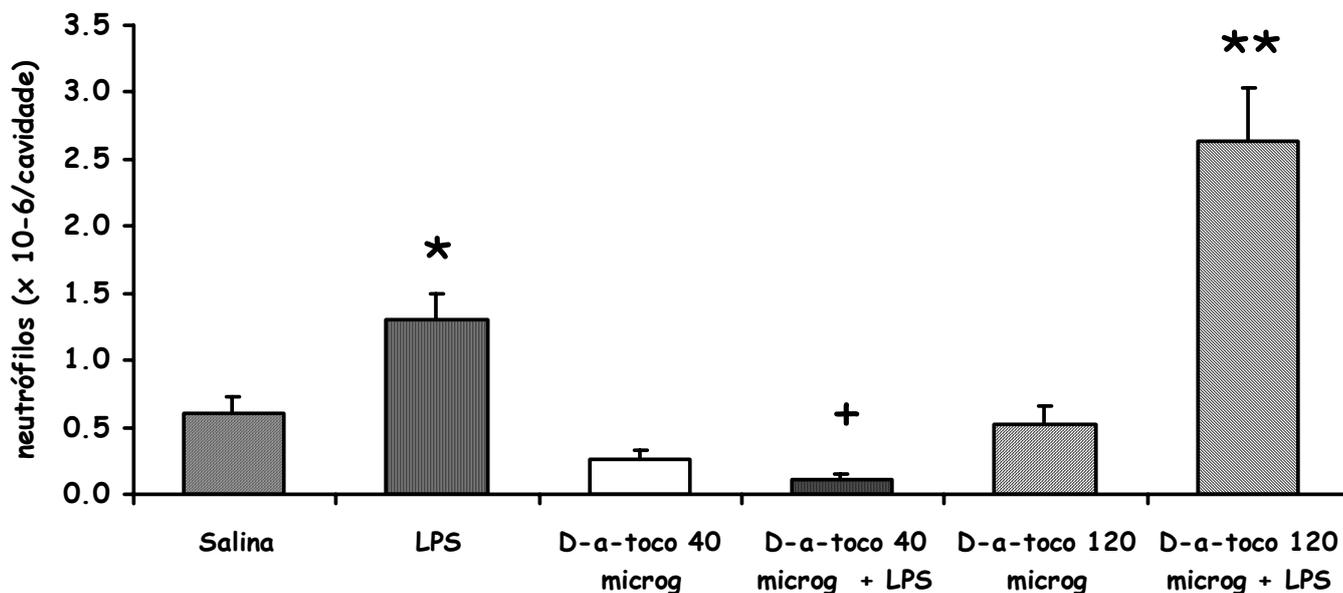


Figura 4.1 – D-α-tocoferol modula o acúmulo peritoneal de neutrófilos induzido pelo LPS *in vivo*.

Camundongos C57BL6 foram tratados com uma única injeção i.p. de D-α-tocoferol (40µg ou 120 µg/cavidade) e estimulados 30 minutos após com LPS *in situ* (500 ng/cavidade). *D-α-toco 40 microg* e *D-α-toco 120 microg* são legendas que indicam D-α-tocoferol 40 µg/cavidade e D-α-tocoferol 120 µg/cavidade, respectivamente. O gráfico mostra a contagem de neutrófilos presentes no lavado peritoneal 6h após o estímulo, a saber: salina, $0,60 \pm 0,13 \times 10^6$ células/cavidade; LPS: $1,31 \pm 0,19 \times 10^6$ células/cavidade; D-α-toco 40 microg: $0,26 \pm 0,07 \times 10^6$ células/cavidade; D-α-toco 40 microg + LPS: $0,11 \pm 0,03 \times 10^6$ células/cavidade; D-α-toco 120 microg: $0,52 \pm 0,13 \times 10^6$ células/cavidade; D-α-toco 120 microg + LPS: $2,40 \pm 0,40$. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (n=6). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado (LPS) e o grupo tratado com salina ($p < 0,05$) e o sinal de adição (+) indica diferença significativa entre o grupo estimulado (LPS) e o estimulado e previamente tratado com D-α-tocoferol (40µg/cavidade) ($p < 0,01$). O duplo asterico (**) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado (LPS) e o grupo estimulado e previamente tratado com D-α-tocoferol (120µg/cavidade) ($p < 0,001$). (ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.1.2. α -Tocoferol não altera os níveis de LTB₄ na resposta inflamatória pelo LPS.

Embora nossos resultados mostrem um efeito antagônico do α -tocoferol na peritonite aguda induzida pelo LPS, nosso grupo decidiu investigar apenas os mecanismos que envolvem a dose antiinflamatória, devido à possibilidade de aplicação terapêutica.

Na resposta inflamatória induzida pelo LPS, há a produção de LTB₄ que, por sua vez, é fator quimiotático de neutrófilos para o sítio inflamatório [119]. Alguns estudos já demonstraram que o α -tocoferol é capaz de diminuir a secreção de mediadores inflamatórios por inibição das enzimas que participam do metabolismo do ácido araquidônico [25, 27].

Como a vitamina E inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, decidimos investigar se a inibição da secreção de LTB₄ pelo tocoferol poderia ser um dos mecanismos de ação nessa resposta. A análise de LTB₄ no sobrenadante do lavado peritoneal mostrou que este está presente no fenômeno e, portanto, não é o alvo do α -tocoferol na inibição neutrofilica.

4.1.3. A quimiocina CXC/KC está envolvida na inibição de neutrófilos pelo α -Tocoferol.

A IL-8 é uma quimiocina humana pró-inflamatória produzida por uma série de tipos celulares, incluindo monócitos, granulócitos e células epiteliais e endoteliais[96]. A proteína homóloga em camundongos é chamada KC [120].

Devido ao envolvimento do KC no recrutamento de neutrófilos induzido pelo LPS [121, 122] e, somando-se a isso a evidência de não ser o LTB₄ o mediador inibido pelo α -tocoferol, decidimos investigar se o KC estaria envolvido nesse fenômeno (Figura 4.2, painel B).

A dosagem de KC no lavado peritoneal mostrou que a produção desta quimiocina é inibida na presença de α -tocoferol, sugerindo que o KC está envolvido no mecanismo antiinflamatório da vitamina E na inflamação pelo LPS. Nossos resultados demonstram que a vitamina E é capaz de inibir a secreção de KC *in vivo* pela primeira vez na literatura.

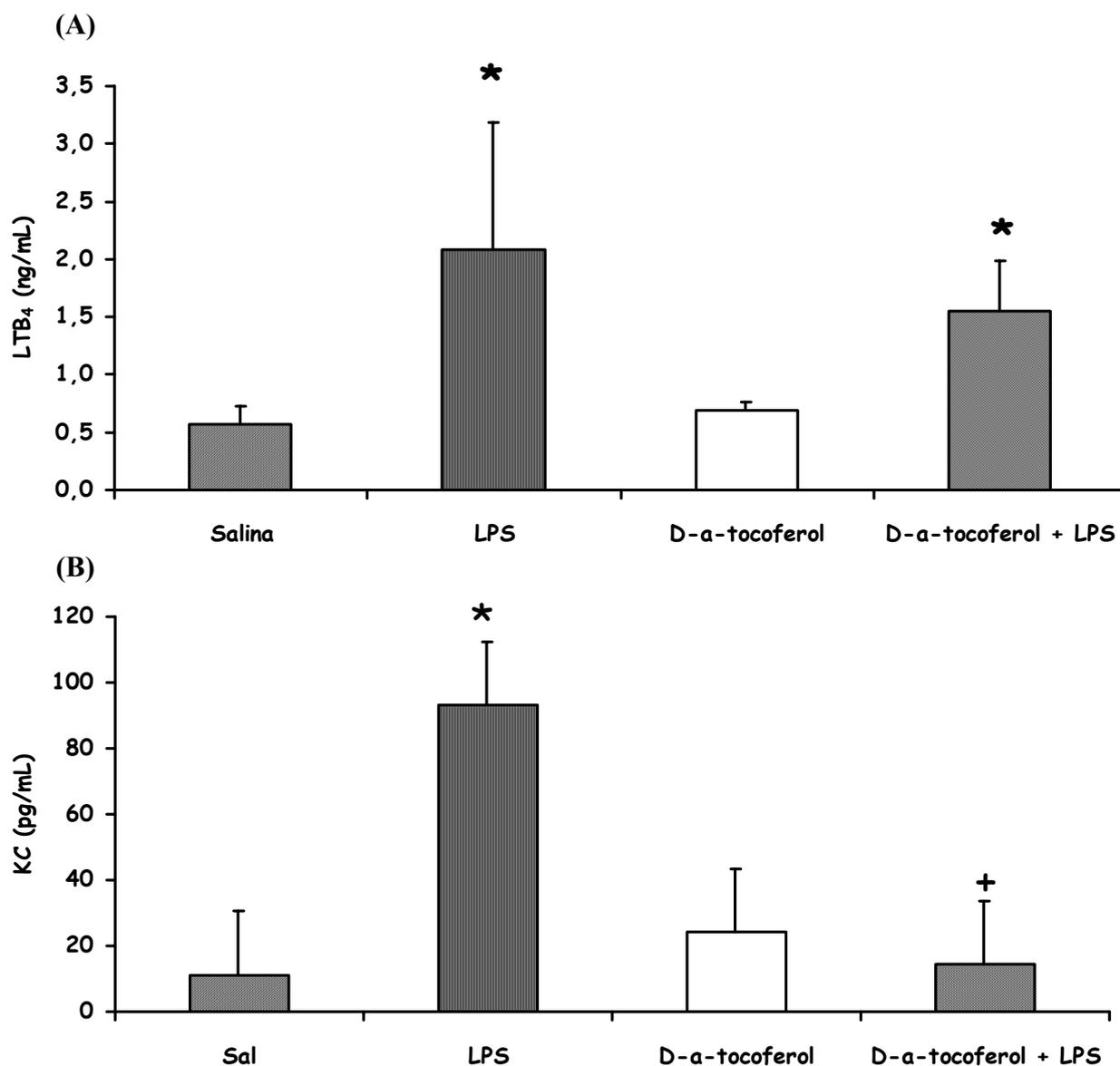


Figura 4.2– Análise de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória do LPS. O lavado peritoneal de animais estimulados com LPS (500 ng/mL) e/ou tratados com D- α -tocoferol (40 μ g/cavidade) foi recolhido e centrifugado para dosagem de LTB₄ e KC. **(A) LTB₄ está presente no lavado peritoneal de animais estimulados com LPS e tratados com α -tocoferol.** O gráfico mostra a dosagem deste mediador 6 horas após o estímulo: controle: 0.56 \pm 0,16 ng/mL; LPS: 2.07 \pm 1,11 ng/mL; α -tocoferol 40 μ g/cavidade+LPS: 1.55 \pm 0,43 ng/mL. Não houve diferença entre os grupos estimulados (LPS) e estimulados e tratados com D- α -tocoferol. **(B) α -tocoferol inibe a secreção de KC na resposta inflamatória induzida pelo LPS *in vivo*.** O gráfico mostra a dosagem de KC no sobrenadante do lavado peritoneal: salina, 11,25 \pm 3,50 pg/mL; LPS, 78,33 \pm 25,72 pg/mL; D- α -tocoferol + LPS, 14,40 \pm 4,47 pg/mL. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n=6). Em (A) e (B), cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n=6). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado e o tratado com salina (p<0,05). O sinal de adição (+) indica diferença significativa entre o grupo estimulado com LPS e o estimulado e tratado com D- α -tocoferol (p<0,05). (ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ *in vivo*: PPAR γ EXERCE EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO NA PERITONITE AGUDA INDUZIDA PELO LPS *IN VIVO*.

4.2.1. GW9662 inibe enquanto rosiglitazona potencializa a resposta inflamatória induzida pelo LPS.

Nossos resultados apontam para um efeito antiinflamatório do D- α -tocoferol que acontece envolvendo a inibição da secreção da quimiocina KC.

Alguns estudos *in vitro* demonstram que o agonista de PPAR γ 15d-PGJ₂ induz a secreção de IL-8/KC, sugerindo que a ativação do PPAR γ pode aumentar a síntese dessa quimiocina [107]. Sabendo que estudos *in vitro* já relacionaram a vitamina E com o este receptor [3, 36], podemos supor que a diminuição de KC *in vivo* pelo α -tocoferol ocorre por meio da regulação da atividade do PPAR γ .

No entanto, o papel do PPAR γ é controverso no que diz respeito à resposta inflamatória induzida pelo LPS, como já mencionado anteriormente [74, 103, 104, 106, 107]. Por isso, para de fato avaliarmos se a atuação do tocoferol envolve modulação do PPAR γ , foi necessário também caracterizar a atividade deste receptor no modelo *in vivo* utilizado. O antagonista seletivo e o agonista sintético deste receptor, GW9662 e Rosiglitazona respectivamente, foram utilizados como ferramentas investigativas na forma de tratamentos para o LPS.

Camundongos C57BL6 foram pré-tratados com uma injeção i.p. de GW9662 (0,500 mg/kg) ou Rosiglitazona (0,250 mg/kg) 30 minutos antes de serem estimulados com LPS *in situ* (500 ng/cavidade). Os parâmetros avaliados foram as contagens total e diferencial de leucócitos. Observou-se que a migração de neutrófilos induzida pelo LPS foi inibida pelo pré-tratamento com o GW9662 e que a droga não possui efeitos quando administrada sozinha (figura 4.3).

De modo semelhante, a rosiglitazona (0,250 mg/kg) sozinha não foi capaz de induzir acúmulo de neutrófilos no peritônio. Porém, o pré-tratamento com este fármaco quando associado ao LPS foi capaz de potencializar o acúmulo dessas células 6h após o estímulo (figura 4.4). Este fenômeno sugere um sinergismo entre este agonista de PPAR γ e o LPS na resposta inflamatória observada. A potencialização do efeito do LPS causada pela rosiglitazona foi evidente na análise da contagem de neutrófilos sanguíneos. Estes resultados

confirmam a participação do PPAR γ no acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal induzido por LPS neste modelo experimental.

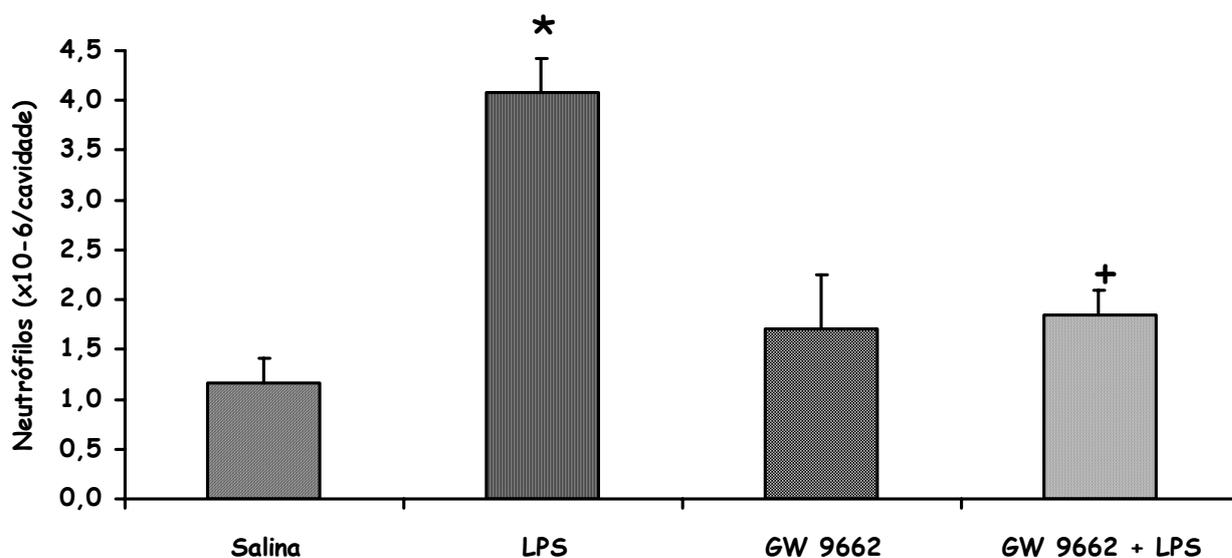


Figura 4.3 – O antagonista de GW 9662 inibe o acúmulo peritoneal de neutrófilos induzido pelo LPS. Camundongos C57BL6 foram pré-tratados com uma injeção i.p. de GW 9662 (0,5 mg/kg) 30 minutos antes do estímulo com LPS (500 ng/cavidade). O gráfico mostra a contagem de neutrófilos presentes no lavado peritoneal 6h após o estímulo com LPS. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n=6), a saber: salina: $1,16 \pm 0,26 \times 10^6$ células/cavidade; LPS: $4,08 \pm 0,34 \times 10^6$ células/cavidade; GW9662: $1,71 \pm 0,25 \times 10^6$ células/cavidade; GW9662 + LPS: $1,85 \pm 0,10 \times 10^6$ células/cavidade. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado (LPS) e tratado com salina, enquanto o sinal de adição (+) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado e o grupo estimulado e previamente tratado com GW9662 ($p < 0,05$). (ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls).

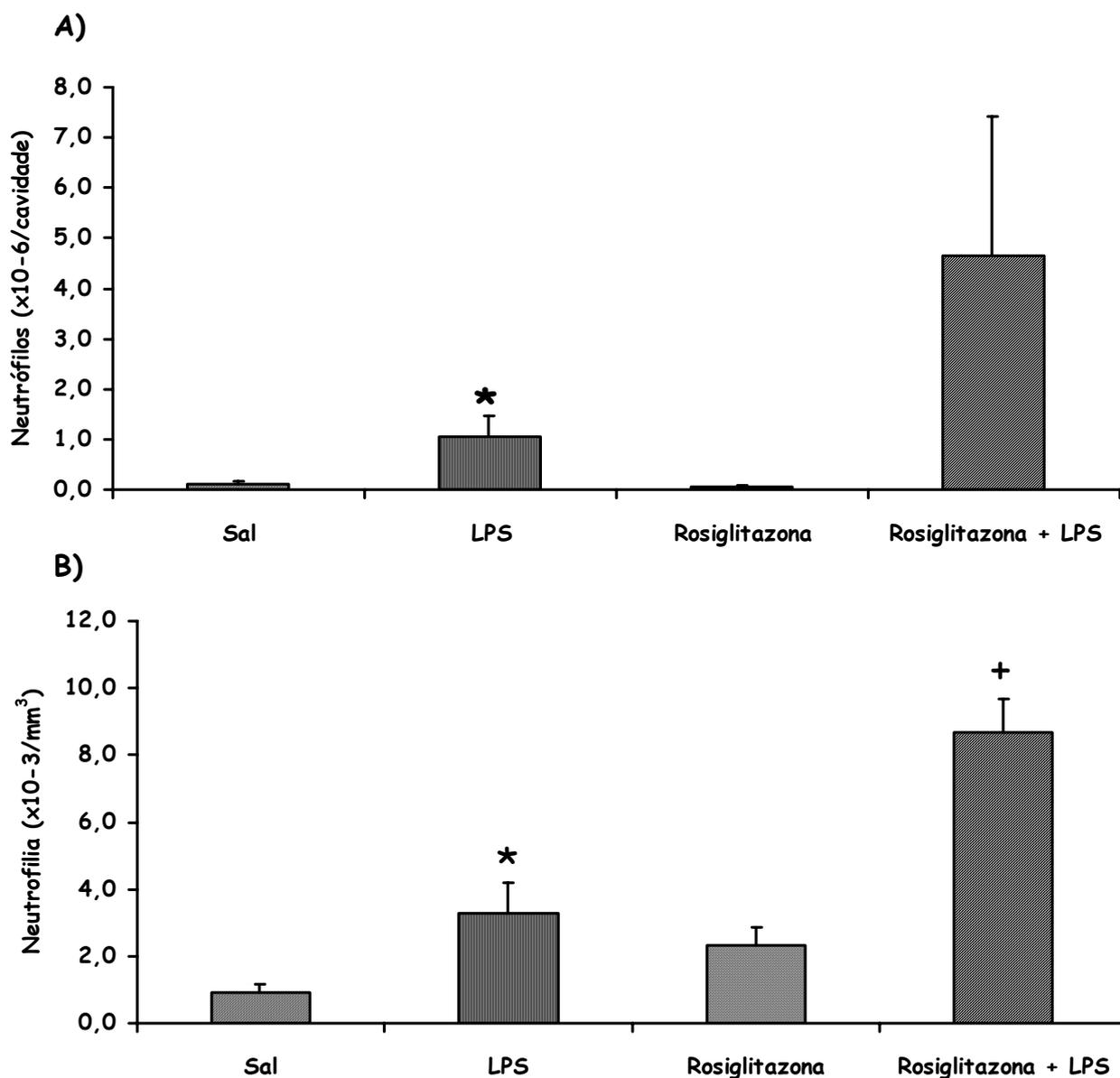


Figura 4.4 – O agonista do receptor nuclear PPAR γ , rosiglitazona, aumenta o número de neutrófilos na cavidade peritoneal e potencializa a neutrofilia sanguínea na peritonite aguda induzida pelo LPS. Camundongos C57BL6 ou Swiss foram tratados com uma única injeção i.p. de rosiglitazona (0,250 mg/kg) 30 minutos antes do estímulo com LPS (500 ng/cavidade). Os gráficos mostram a contagem de neutrófilos presentes no lavado peritoneal (A) e no sangue (B) 6h após o estímulo com LPS. Em (A): salina, $0,23 \pm 0,12 \times 10^6$ células/cavidade; LPS, $0,44 \pm 0,18 \times 10^6$ células/cavidade; LPS + rosiglitazona: $1,25 \pm 0,27 \times 10^6$ células/cavidade. Em (B): salina: $0,90 \pm 0,28 \times 10^3$ células/mm³; LPS: $3,29 \pm 0,91 \times 10^3$ células/mm³; LPS + Rosiglitazona: $8,67 \pm 0,99 \times 10^3$ células/mm³. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n=6). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado com LPS e o tratado com salina. O sinal de adição (+) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo estimulado com LPS e o grupo estimulado com LPS e tratado com rosiglitazona. (ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.3. PPAR γ ESTÁ ENVOLVIDO NA AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DO α -TOCOFEROL

4.3.1. α -tocoferol antagoniza os efeitos do agonista de PPAR γ rosiglitazona *in vitro*

A caracterização da atividade do PPAR γ no modelo de peritonite pelo LPS nos permite formular a hipótese de que a inibição da atividade do PPAR γ pelo α -tocoferol pode ser um dos mecanismos de atuação desta vitamina.

Resultados de literatura reforçam essa hipótese. Foi demonstrado que o D- α -tocoferol é capaz de diminuir a expressão do receptor *scavenger* CD36 [25, 123, 124]; como a expressão deste receptor é estimulada pela ativação do PPAR γ [39, 56], é viável sugerir que a diminuição da expressão de CD36 pelo tocoferol esteja ocorrendo via modulação da atividade do PPAR γ . No entanto, nenhum ensaio farmacológico envolvendo vitamina E e PPAR γ foi realizado até o presente momento.

Para avaliar então se o D- α -tocoferol pode modular a atividade do receptor nuclear PPAR γ , nosso grupo realizou ensaios *in vitro* tendo a rosiglitazona como ferramenta investigativa.

Um dos modelos utilizados foi a cultura de macrófagos peritoneais. Camundongos C57BL6 *naive* tiveram seu lavado peritoneal recolhido e as células presentes, plaqueadas. O tratamento com D- α -tocoferol (100 μ M) ocorreu 15 minutos antes do estímulo a rosiglitazona (5 μ M). Após 6 horas, o sobrenadante foi recolhido para a análise da quimiocina KC, já que este foi o mediador inflamatório inibido pelo α -tocoferol *in vivo*.

De forma interessante, a rosiglitazona aumentou a secreção de KC pelos macrófagos peritoneais de forma significativa enquanto que o D- α -tocoferol inibiu esta secreção. Este resultado sugere que o α -tocoferol atua antagonizando os efeitos da ativação do PPAR γ .

Para confirmar se de fato o D- α -tocoferol inibe a atividade do PPAR γ , optamos pela utilização de um segundo modelo *in vitro*, mais específico: a transfecção transitória. É bem conhecido que o uso de sistemas de gene repórter são úteis quando se quer investigar utilizar um sistema de gene repórter modelo de transfecção transitória, já que sistemas de gene repórter têm contribuído de forma importante para o estudo da expressão e regulação gênica [125, 126].

Para isso, células RAW 264,7 foram transfectadas com o gene repórter que contém tanto a sequência responsiva ao PPAR γ , chamada PPRE, como as sequências promotoras do receptor *scavenger* CD36 e da enzima Luciferase. Esta última cliva uma substância chamada luciferina. Assim, ao acrescentarmos esta substância às amostras, se existir luciferase expressa nas mesmas, haverá luminescência. Uma vez que o gene da luciferase está conjugado ao promotor do CD36 e este contém o elemento responsivo do PPAR γ , haverá aumento da expressão de luciferase somente se houver iniciação da transcrição pelo PPRE, o que significa que o PPAR γ deve obrigatoriamente ser ativado (ver figura 4.1.9). (ver material e métodos, capítulo 3.2). Além disso, como esta linhagem celular tem baixa expressão de PPAR γ , as células também receberam o plasmídeo contendo o gene que codifica este receptor, de forma a amplificar o sinal obtido no modelo.

As células RAW 264,7 foram transfectadas durante um período de 3 horas, sendo imediatamente tratadas com D- α -tocoferol (100 μ M) e estimuladas 15 minutos depois com rosiglitazona (1 μ M). Vinte e quatro horas depois, foi observado que o α -tocoferol reduziu a expressão de CD36-luciferase induzida pelo agonista rosiglitazona, como demonstrado indiretamente pela diminuição das unidades relativas de luciferase. Os valores, demonstrados na figura 4.1.8, foram ajustados para a quantidade de β -galactosidase.

Nossos resultados demonstram claramente a capacidade do α -tocoferol de antagonizar os efeitos do PPAR γ .

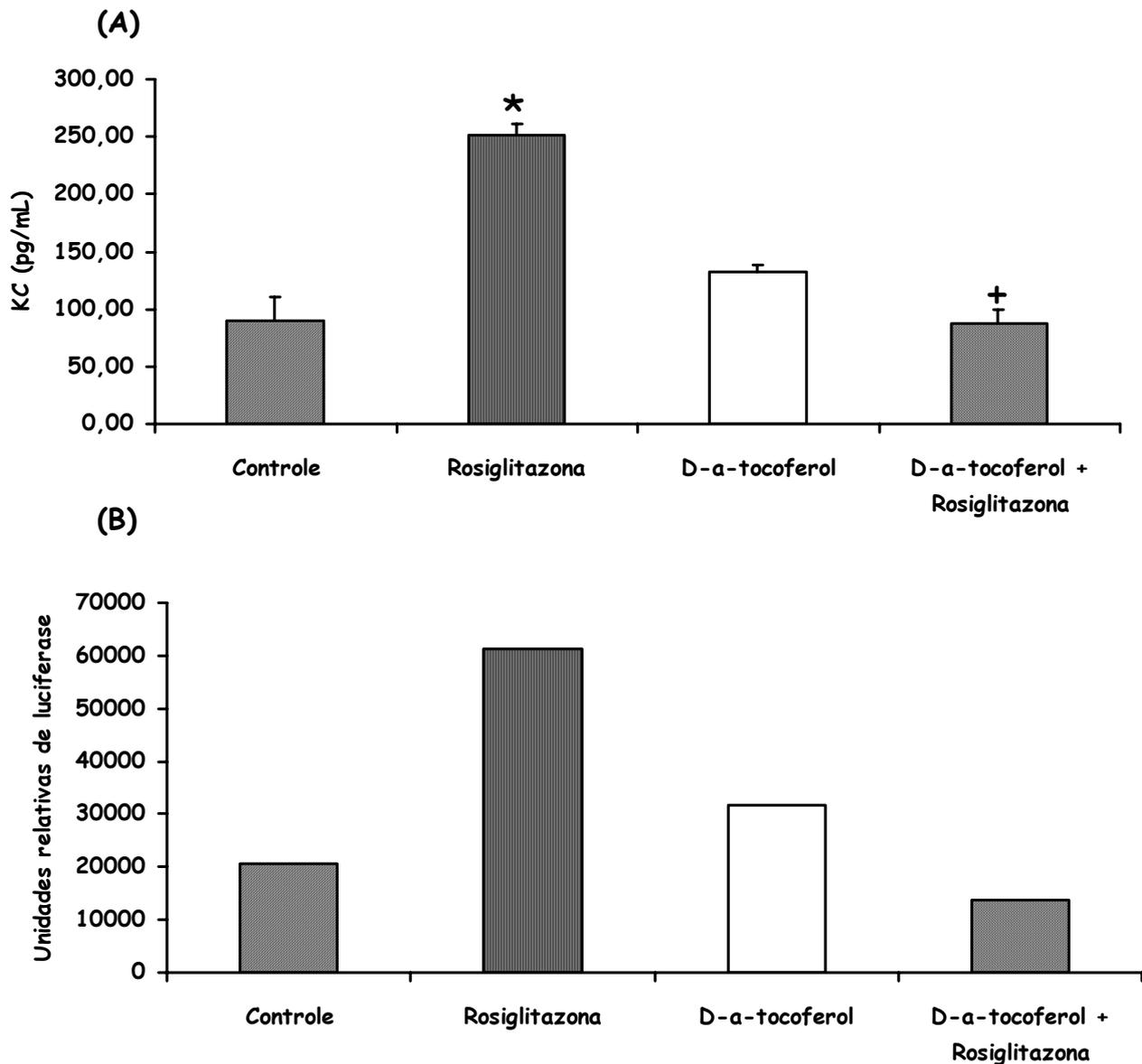


Figura 4.5 – D- α -Tocoferol antagoniza os efeitos do PPAR γ *in vitro*. (A) O α -tocoferol inibe a secreção de KC induzida pela rosiglitazona *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL6 foram plaqueados e tratados com D- α -tocoferol (25 μ M) 15 minutos antes do estímulo com o agonista de PPAR γ rosiglitazona (5 μ M). Após 6 horas, o sobrenadante da cultura foi recolhido para análise da quimiocina KC. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n=2). Valores em pg/mL: controle, 90 \pm 20,51 pg/mL; Rosiglitazona, 251,50 \pm 9,19 pg/mL; D- α -tocoferol; D- α -tocoferol + rosiglitazona, 119 \pm 2,83 pg/mL. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa o grupo controle e o estimulado com rosiglitazona (p<0,01) enquanto que o sinal de adição indica diferença estatística significativa entre o grupo estimulado com rosiglitazona e o estimulado mas tratado com D- α -tocoferol (p<0,01). (B) O α -tocoferol inibe a expressão de luciferase induzida pela Rosiglitazona. Células RAW 264,7 foram transfectadas com o gene repórter contendo a região promotora de CD36 acoplada ao gene da luciferase. Na seqüência *upstream*, a região PPRE, responsiva ao PPAR γ ativado. As células foram tratadas com D- α -tocoferol (100 μ M) e estimuladas com rosiglitazona (1 μ M). A expressão da luciferase nos macrófagos foi avaliada 24 h após o estímulo indiretamente por luminescência. Cada barra representa a média das unidades relativas de luciferase, obtidas por meio da razão entre a média das unidades de luciferase (leitura de dois poços – duplicata) e as unidades de β -galactosidase.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Em 1922, a descoberta de um fator essencial para a reprodução e que só poderia ser obtido por meio da dieta, movimentou o mundo científico [1].

Quatorze anos após a publicação de Evans e Bishop, dois compostos diferentes, mas que apresentavam a mesma atividade do fator descoberto em 1922, foram isolados do óleo de trigo. A partir daí, verificou-se que este fator não era apenas uma única molécula, mas uma série delas que tinham a mesma atividade fisiológica. A atividade característica das moléculas que compunham esse grupo foi chamada atividade de vitamina E [2].

Quase um século depois, o γ -tocoferol tornou-se a forma de vitamina E predominante da alimentação humana. No entanto, é o RRR- α -tocoferol o isômero mais abundante no plasma humano [127]. Apesar de todas as formas serem absorvidas igualmente no intestino delgado [12], ocorre no fígado a incorporação preferencial do α -tocoferol nas lipoproteínas [128]. A secreção de lipoproteínas ricas em α -tocoferol se faz por meio da enzima α -TTP, que pode inclusive estar presente nas membranas celulares [13, 19]. A caracterização de outra proteína citosólica associada ao tocoferol, a TAP, mostra que existe uma distribuição e um tráfego celular exclusivos para esta estrutura [16, 17, 129]

Sabe-se que o α -tocoferol pode apresentar efeitos opostos quando utilizado em doses diferentes em um mesmo modelo experimental [35, 36]. Os efeitos antagônicos do α -tocoferol foram demonstrados pela primeira vez em 1994. Keaney Jr e seus colaboradores demonstraram que baixas doses de α -tocoferol melhoravam e altas doses pioravam a função endotelial de aortas de coelhos [35]. Apesar de este estudo datar de mais de 10 anos, apenas mais dois outros estudos, ambos *in vitro*, demonstraram estes efeitos antagônicos em outros modelos [36, 37]. Desta forma, a atividade biológica da vitamina E, em especial do D- α -tocoferol, permanece por ser elucidada.

Para avaliar os efeitos da administração do α -tocoferol, nosso grupo utilizou o modelo de peritonite aguda subletal induzida pelo LPS. A resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano utilizado caracteriza-se como do tipo subletal porque a inflamação ocorre, porém não é suficiente para provocar alterações hemodinâmicas que levariam o animal à morte.

Nossos resultados apontam para um efeito antiinflamatório da vitamina E quando administrado em baixas doses. A inibição da migração de neutrófilos caracteriza o D- α -tocoferol como um potente agente antiinflamatório, visto que apenas 40 μ g/cavidade (5 UI de vitamina E/kg) foram necessários para inibir os efeitos do LPS *in vivo*.

A dose antiinflamatória utilizada está de acordo com a mencionada pela literatura, apesar de sua aplicação em diferentes modelos experimentais e por diferentes vias de administração. Em humanos, por exemplo, a suplementação benéfica de vitamina E é, em média, igual a 400 UI/dia [34]. Considerando um indivíduo adulto do sexo masculino, e que tenha massa corporal igual a 70 Kg, essa suplementação seria igual a 5 UI/Kg, o que corresponde a menor dose utilizada em nosso modelo (40µg/cavidade).

De forma interessante, quando administrado em uma dose maior (120µg/cavidade), o α -tocoferol potencializou o infiltrado leucocitário no peritônio, contribuindo assim para uma maior resposta ao LPS. É importante ressaltar que esta dose em nada se associa a toxicidade desta vitamina, visto que doses tóxicas estariam próximas de 80 UI/Kg [130]. A dose utilizada corresponde a 15 UI/Kg, correlacionando inclusive à doses pró-inflamatória em humanos [34]. Além disso, o α -tocoferol quando administrado sozinho não potencializou o acúmulo neutrofílico, mostrando que sua atividade depende de uma condição inflamatória associada. Isto mostra, pela primeira vez, uma atividade biológica também díspare desta vitamina neste tipo específico de inflamação. Mas, a princípio, preferimos investigar apenas os mecanismos envolvidos no efeito antiinflamatório da mesma, devido a maior possibilidade de aplicação terapêutica.

A concentração final de 0,45% de etanol nos grupos tratados com tocoferol trouxe a preocupação de interferência do veículo no fenômeno observado [131, 132]. Embora os grupos salina e LPS também tenham recebido etanol a 0,45%, nosso grupo realizou experimentos comparando grupos estimulados com LPS tendo como tratamentos etanol a 0,1% e a 0,45%. Não houve diferença no acúmulo de neutrófilos nas duas concentrações avaliadas (dados não mostrados). Além disso, cabe ressaltar que, embora seja um micronutriente e por isso sua via de administração comum seja a oral, a administração do α -tocoferol no peritônio se justifica no sentido de que o objetivo foi avaliar o efeito farmacológico do mesmo sem a interferência de fatores como a absorção intestinal.

Um dos mediadores essenciais na resposta inflamatória local induzida pelo LPS é a secreção do fator de ativação plaquetária, o PAF. No entanto, sabe-se que alguns efeitos do PAF, como o influxo de polimorfonucleares para a cavidade estimulada, são exercidos na presença de metabólitos do ácido araquidônico, em especial o LTB₄ [119]. Por isso, nosso grupo decidiu investigar se a inibição do infiltrado neutrofílico poderia ocorrer via alteração dos níveis desse mediador.

De forma interessante, nossos experimentos demonstraram que, apesar do LTB₄ estar presente no fenômeno, ele não é inibido pelo α -tocoferol. Este resultado surpreende na

medida em que já foi demonstrado que o tocoferol é capaz de alterar a secreção de LTB₄ em outros modelos de inflamação, como a induzida por carragenina [25, 26].

A IL-8 é um importante mediador inflamatório que se utiliza de diferentes eventos para exercer sua função, como a ativação celular e quimiotaxia de polimorfonucleares [133]. Originalmente identificada como um fator quimiotático para neutrófilos [134], é também quimiotática para basófilos e linfócitos T [97, 135]. A proteína KC é a homóloga da IL-8 humana em camundongos [120].

Em nossos experimentos, a quimiocina KC teve valores significativamente altos nos grupos estimulados com LPS, tendo sua secreção inibida nos grupos tratados com α -tocoferol. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que o α -tocoferol é capaz de diminuir a secreção de KC na resposta inflamatória pelo LPS *in vivo*. Os baixos níveis desta quimiocina na presença da vitamina E podem explicar o efeito antiinflamatório da mesma.

Diversos mediadores inflamatórios são estímulos para a secreção de IL-8. Dentre eles, podemos destacar o TNF- α . Este é um dos primeiros mediadores secretados durante a resposta ao LPS [136] pela via de sinalização que envolve o NF κ B [137, 138]. Já foi demonstrado *in vitro* que o TNF- α é capaz de aumentar em 50 vezes a secreção de IL-8 em apenas 1 hora de estímulo e esta secreção é dependente do status redox celular [139]. A vitamina E, em especial o α -tocoferol, é um dos antioxidantes mais potentes descritos na literatura, sendo esta, inclusive, o mais abundante do plasma humano [8]. Portanto, é plausível pensar que o α -tocoferol atua impedindo a alteração desse estado redox da célula, interferindo, por exemplo, na sinalização do próprio NF κ B. Com isso, haveria diminuição da secreção dos mediadores inflamatórios envolvidos. No entanto, um dos fatores que talvez refute esta hipótese é a própria evidência de que o LTB₄ encontra-se inalterado no fenômeno observado, sugerindo então uma atuação mais específica desse tipo da vitamina.

Além disso, foi publicado em 2006 um estudo *in vitro* que demonstrou que o agonista endógeno de PPAR γ , a 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) sinergiza com o LPS em células do tipo THP-1 aumentando tanto a expressão do RNA mensageiro para IL-8 como a proteína em si [106]. O PPAR γ é um receptor nuclear que age na transcrição de genes envolvidos na inflamação [39].

A evidência de que um agonista de PPAR γ pode aumentar a expressão de IL-8 somada ao fato de que o acúmulo de neutrófilos *in vivo* pelo α -tocoferol cursa com inibição desta quimiocina, levou-nos a pensar que um dos mecanismos da ação antiinflamatória da vitamina E poderia ser a modulação da atividade do PPAR γ . A necessidade de se caracterizar a

atividade biológica do PPAR γ também no modelo utilizado se justifica porque este receptor também demonstra efeitos anti e pró-inflamatórios[74, 103, 104, 106, 107].

Para endereçar a questão do tipo de atividade biológica do PPAR γ na resposta inflamatória induzida pelo LPS *in vivo*, utilizamos uma abordagem farmacológica, com a utilização do agonista e do antagonista seletivo deste receptor.

O GW 9662 é um antagonista seletivo de PPAR γ . Isto significa dizer que este fármaco inibe preferencialmente esta isoforma do PPAR. Só há possibilidade do GW também bloquear ou mesmo ativar os outros tipos de PPAR se administrado em concentrações muito elevadas (leesnitzer et al). Ao ser administrado intraperitonealmente 30 minutos antes da administração do LPS no mesmo local, o GW 9662 também foi capaz de bloquear o acúmulo de neutrófilos. Esta evidência sugere que o α -tocoferol, quando atua como antiinflamatório, apresenta semelhança no mecanismo de ação utilizado pelo GW 9662.

A rosiglitazona é uma molécula da família das tiazolidinedionas que possui alta afinidade pelo receptor PPAR γ [78]. No nosso modelo, quando este fármaco foi administrado como tratamento do LPS, houve um maior acúmulo de neutrófilos no peritônio. No entanto, este acúmulo não foi significativo, apesar de ser 50% maior que o do grupo apenas estimulado com LPS (ver figura 4.4). Por isso, decidimos investigar a neutrofilia sanguínea desses animais. De forma interessante, nos animais co-tratados com rosiglitazona e LPS, houve uma potencialização da resposta quando comparada a do grupo apenas estimulado. Os resultados envolvendo os ligantes de PPAR γ , tomados em conjunto, sugerem que este receptor nuclear exerce efeito pró-inflamatório na resposta induzida pelo LPS *in vivo*.

A caracterização da atividade do PPAR γ no modelo utilizado reforça a hipótese de que a inibição da atividade deste receptor é o mecanismo de ação envolvido na inibição de KC pelo α -tocoferol *in vivo*.

Para estabelecer uma relação direta entre o α -tocoferol e o PPAR γ , nosso grupo resolveu utilizar dois modelos de experimentos *in vitro*: a cultura de macrófagos peritoneais e a transfecção transitória com macrófagos modificados. A cultura deste tipo celular justifica-se como um bom modelo de estudo porque já foi demonstrado *in vitro* que macrófagos peritoneais estimulados com LPS secretam tanto LTB₄ como IL-8, o que evidencia a importância dessas células na secreção desses mediadores [140].

Nos experimentos envolvendo macrófagos peritoneais, a rosiglitazona aumentou a secreção da quimiocina KC no período de 6 horas, enquanto que o tratamento com α -tocoferol inibe os efeitos daquele fármaco. Isto sugere que o α -tocoferol antagoniza os efeitos decorrentes da ativação do PPAR γ e que a inibição desse receptor pode ser um dos

mecanismos envolvidos na resposta inflamatória ao LPS *in vivo*. As diferenças de secreção de KC observadas não podem ser atribuídas ao número de células tratadas e/ou estimuladas, visto que nem o estímulo nem o tratamento alteraram a viabilidade celular (dados não mostrados).

Alguns autores sugerem que a secreção de KC por agonistas de PPAR γ como a 15d-PGJ₂ pode ocorrer independente da ativação deste receptor, pois a utilização outros agonistas, como a troglitazona, não exercem os mesmos efeitos [101, 141]. Cabe ressaltar que contraditoriamente, alguns estudos demonstraram que a troglitazona exerce os mesmos efeitos observados para a 15d-PGJ₂ *in vitro*, sendo apenas menos potente [102, 142]. Por isso, não cabe aqui justificativa para uma sinalização por outra via, visto que mesmo *in vivo*, o GW9662 e a rosiglitazona apresentaram efeitos antagônicos no mesmo modelo experimental, como era esperado por nosso grupo.

Para estabelecer definitivamente uma relação entre este receptor e a vitamina E, células da linhagem RAW 267,4 foram transfectadas com plasmídeos que contêm o receptor nuclear PPAR γ e o gene repórter CD36. Isto significa que se ocorrer qualquer alteração na atividade do PPAR γ , conseqüentemente haverá alteração da transcrição da enzima luciferase, sendo, portanto, um bom modelo para estudar a relação do α -tocoferol com esse receptor.

De acordo com nossos resultados, a rosiglitazona - agonista do PPAR γ - foi capaz de aumentar as unidades relativas de luciferase, conforme esperado. O α -tocoferol sozinho não aumentou a expressão do gene repórter. No entanto, quando as células foram estimuladas com rosiglitazona e tratadas com α -tocoferol, observou-se uma inibição da expressão de luciferase. De uma forma geral, nossos experimentos *in vitro* mostraram que o α -tocoferol pode antagonizar os efeitos do agonista de PPAR γ rosiglitazona.

Muito se tem discutido sobre a possível relação entre os mecanismos de atuação do vitamina E e o receptor nuclear PPAR γ . No entanto, os resultados são controversos: enquanto que o γ -tocoferol pode aumentar a expressão de PPAR γ *in vitro*, o α -tocoferol não aumenta a expressão do mesmo em sua concentração antiinflamatória, evidência que alguns autores usam para afirmar que não existe relação entre esta molécula e aquele receptor. Cabe ressaltar, no entanto, que a ativação de um receptor por seu agonista ou mesmo a inibição pelo antagonista, não leva necessariamente ao aumento ou inibição da expressão do receptor.

Foi recentemente demonstrado que baixas doses de α -tocoferol não parecem interferir na expressão desse receptor [36]. Nossos dados revelam que possivelmente o efeito antiinflamatório do α -tocoferol está sendo realizado via PPAR γ . Se isto estiver ocorrendo no nosso modelo, pode-se esperar então que o PPAR γ esteja exercendo um papel inflamatório

crucial na resposta ao LPS e que o GW associado ao α -tocoferol em doses subótimas poderiam atuar sinergicamente.

É interessante também observar que até o presente momento, não há relatos na literatura de outras vias por meio das quais a rosiglitazona possa sinalizar sem ser o PPAR γ . No entanto, considerando que o agonista 15d-PGJ₂ também pode aumentar sozinho os níveis de KC, é plausível aceitar que apenas a ativação deste receptor pela rosiglitazona possa culminar com a secreção daquela quimiocina. Isto se justifica perante o fato de que, para iniciar a transcrição gênica, não são necessários outros eventos celulares, mas apenas a ativação desse receptor.

Esses dados sugerem, pela primeira vez na literatura, que o α -tocoferol pode inibir a síntese de KC via PPAR γ , o que estabelece uma forte relação de antagonismo entre a vitamina E e o PPAR γ . Além disso, neste trabalho caracterizou-se pela primeira vez, o efeito antiinflamatório do α -tocoferol na resposta inflamatória induzida pelo LPS *in vivo*, com contribuições importantes na elucidação dos possíveis mecanismos, entre eles a inibição da síntese da quimiocina KC.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho permitem-nos concluir que o D- α -tocoferol pode exercer atividade biológica antiinflamatória importante na resposta induzida pelo LPS. Esta atividade provavelmente envolve a inibição do receptor nuclear PPAR γ com conseqüente diminuição da quimiocina KC, resultando assim em um acúmulo neutrofílico menor nos animais tratados com vitamina E.

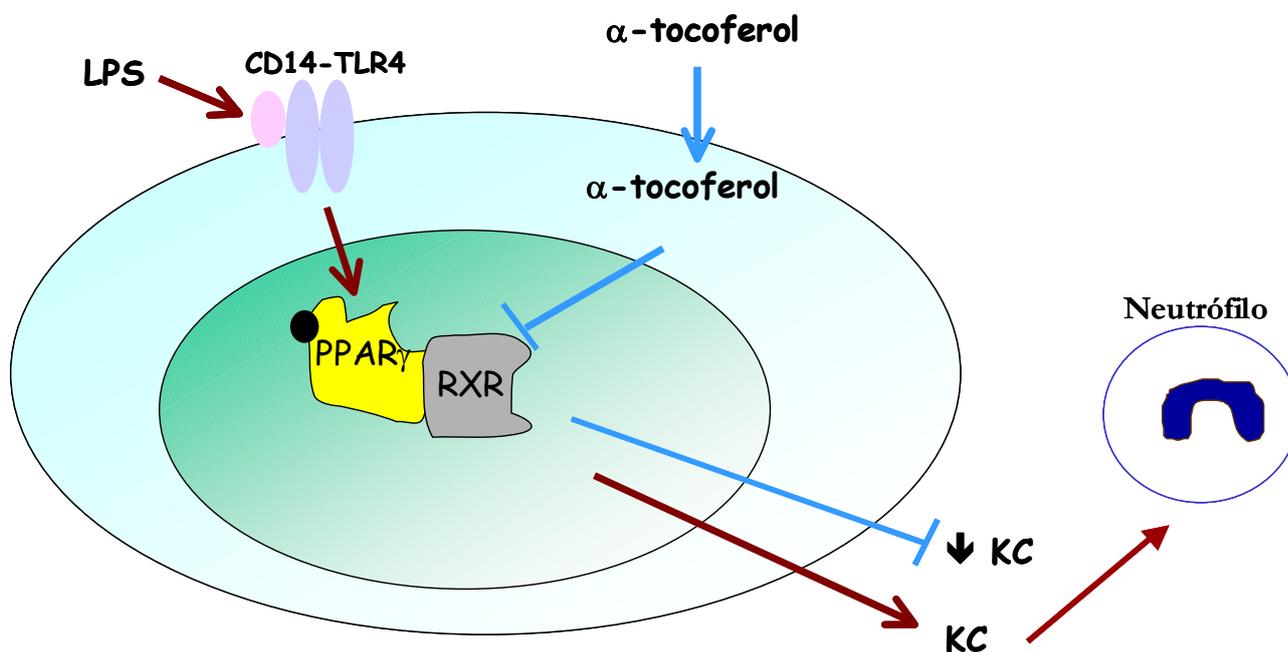


Figura 6.1 – Esquema conclusivo – α -tocoferol inibe a atividade do receptor nuclear PPAR γ diminuindo a secreção de KC e o acúmulo neutrofílico induzido pelo LPS.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Evans, H.M. and K.S. Bishop, On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 1922. **56**(1458): p. 649-651.
2. Evans, H.M. and O.H. Emerson, The isolation from wheat germ oil of an alcohol, a-tocopherol, having the properties of vitamin E. *Journal of Biological Chemistry*, 1936. **113**(1): p. 319-332.
3. Campbell, S.E., et al., Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*, 2003. **3**: p. 25.
4. Ivanov, S.A. and K. Aitzetmüller, Untersuchungen über die tocopherol-und tocotrienolzusammensetzung der. *Fett/Lipid*, 1998. **100**(8): p. 348-352.
5. Jiang, Q., et al., gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr*, 2001. **74**(6): p. 714-22.
6. Traber, M.G. and P.J. Leonard, The alpha-tocopherol transfer protein and vitamin E adequacy. *Newsletter of Linus Pauling Institute*, 2001.
7. Farrell, P.M. and R.J. Roberts, Vitamin E, in *Modern Nutrition in Health and Disease*, M. Shils and J. Olson, Editors. 1993, Lea & Febiger: Philadelphia. p. 326-341.
8. Azzi, A. and A. Stocker, Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res*, 2000. **39**(3): p. 231-55.
9. Reboul, E., et al., Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem*, 2006. **281**(8): p. 4739-45.
10. Traber, M.G., The ABCs of vitamin E and beta-carotene absorption. *Am J Clin Nutr*, 2004. **80**(1): p. 3-4.
11. Anwar, K., H.J. Kayden, and M.M. Hussain, Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *J Lipid Res*, 2006. **47**(6): p. 1261-73.
12. Traber, M.G., et al., RRR- and SRR-alpha-tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR-alpha-tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1990. **31**(4): p. 675-85.
13. Hosomi, A., et al., Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett*, 1997. **409**(1): p. 105-8.
14. Cohn, W., F. Loechleiter, and F. Weber, Alpha-tocopherol is secreted from rat liver in very low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1988. **29**(10): p. 1359-66.

15. Blatt, D.H., et al., Re-evaluation of the relative potency of synthetic and natural alpha-tocopherol: experimental and clinical observations. *J Nutr Biochem*, 2004. **15**(7): p. 380-95.
16. Zimmer, S., et al., A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization. *J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25672-80.
17. Stocker, A., et al., Identification of a novel cytosolic tocopherol-binding protein: structure, specificity, and tissue distribution. *IUBMB Life*, 1999. **48**(1): p. 49-55.
18. Kayden, H.J. and M.G. Traber, Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res*, 1993. **34**(3): p. 343-58.
19. Min, K.C., R.A. Kovall, and W.A. Hendrickson, Crystal structure of human alpha-tocopherol transfer protein bound to its ligand: implications for ataxia with vitamin E deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 14713-8.
20. Blatt, D.H., S.W. Leonard, and M.G. Traber, Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. *Nutrition*, 2001. **17**(10): p. 799-805.
21. Landes, N., Elucidation of the Mechanism of Side Chain Degradation and Gene Regulatory Functions, in *Deutsches Institut für Ernährungsforschung*. 2005, Universität Potsdam: Potsdam Rehbrücke. p. 105.
22. Azzi, A., et al., Nonantioxidant functions of alpha-tocopherol in smooth muscle cells. *J Nutr*, 2001. **131**(2): p. 378S-81S.
23. Murohara, T., et al., Inhibition of platelet adherence to mononuclear cells by alpha-tocopherol: role of P-selectin. *Circulation*, 2004. **110**(2): p. 141-8.
24. Freedman, J.E., et al., alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation*, 1996. **94**(10): p. 2434-40.
25. Devaraj, S. and I. Jialal, Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(4): p. 1125-33.
26. Jiang, Q. and B.N. Ames, Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *Faseb J*, 2003. **17**(8): p. 816-22.
27. Jiang, Q., et al., gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11494-9.
28. Gysin, R., A. Azzi, and T. Visarius, Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *Faseb J*, 2002. **16**(14): p. 1952-4.

29. Liu, C., R.M. Russell, and X.D. Wang, Alpha-tocopherol and ascorbic acid decrease the production of beta-apo-carotenals and increase the formation of retinoids from beta-carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets in vitro. *J Nutr*, 2004. **134**(2): p. 426-30.
30. Boaz, M., et al., Baseline oxysterols and other markers of oxidative stress, inflammation and malnutrition in the vitamin e and intima media thickness progression in end-stage renal disease (VIPER) cohort. *Nephron Clin Pract*, 2005. **100**(4): p. c111-9.
31. Stephens, N.G., et al., Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 1996. **347**(9004): p. 781-6.
32. Woodson, K., et al., Association between alcohol and lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study in Finland. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(3): p. 219-26.
33. Helzlsouer, K.J., et al., Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(24): p. 2018-23.
34. Miller, E.R., 3rd, et al., Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*, 2005. **142**(1): p. 37-46.
35. Keaney, J.F., Jr., et al., Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest*, 1994. **93**(2): p. 844-51.
36. Hsieh, C.C., C.J. Huang, and B.F. Lin, Low and high levels of alpha-tocopherol exert opposite effects on IL-2 possibly through the modulation of PPAR-gamma, IkappaBalpha, and apoptotic pathway in activated splenocytes. *Nutrition*, 2006. **22**(4): p. 433-40.
37. Hsieh, C.C. and B.F. Lin, Opposite effects of low and high dose supplementation of vitamin E on survival of MRL/lpr mice. *Nutrition*, 2005. **21**(9): p. 940-8.
38. Munteanu, A., R. Ricciarelli, and J.M. Zingg, HIV protease inhibitors-induced atherosclerosis: prevention by alpha-tocopherol. *IUBMB Life*, 2004. **56**(10): p. 629-31.
39. Nicholson, A.C. and D.P. Hajjar, CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*, 2004. **41**(4-5): p. 139-46.

40. Francis, G.A., J.S. Annicotte, and J. Auwerx, PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(2): p. 186-91.
41. Issemann, I. and S. Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990. **347**(6294): p. 645-50.
42. Bishop-Bailey, D., Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(5): p. 823-34.
43. Nolte, R.T., et al., Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 1998. **395**(6698): p. 137-43.
44. Moraes, L.A., L. Piqueras, and D. Bishop-Bailey, Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, 2006. **110**(3): p. 371-85.
45. Gulick, T., et al., The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(23): p. 11012-6.
46. Keller, H., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors and lipid metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. **684**: p. 157-73.
47. Kliewer, S.A., et al., Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(15): p. 7355-9.
48. Fredenrich, A. and P.A. Grimaldi, PPAR delta: an uncompletely known nuclear receptor. *Diabetes Metab*, 2005. **31**(1): p. 23-7.
49. Lim, H. and S.K. Dey, PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. **11**(4): p. 137-42.
50. Bishop-Bailey, D. and T. Hla, Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem*, 1999. **274**(24): p. 17042-8.
51. Delerive, P., J.C. Fruchart, and B. Staels, Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*, 2001. **169**(3): p. 453-9.
52. Clark, R.B., et al., The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol*, 2000. **164**(3): p. 1364-71.
53. Setoguchi, K., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest*, 2001. **108**(11): p. 1667-75.

54. Akbiyik, F., et al., Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood*, 2004. **104**(5): p. 1361-8.
55. Ricote, M., et al., The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
56. Tontonoz, P., et al., PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 241-52.
57. Gosset, P., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(10): p. 2857-65.
58. Faveeuw, C., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett*, 2000. **486**(3): p. 261-6.
59. Lazar, M.A., PPAR gamma, 10 years later. *Biochimie*, 2005. **87**(1): p. 9-13.
60. Blanquart, C., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003. **85**(2-5): p. 267-73.
61. Hu, E., et al., Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2100-3.
62. Chung, S.W., et al., Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 32681-7.
63. Li, M., G. Pascual, and C.K. Glass, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(13): p. 4699-707.
64. Straus, D.S., et al., 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4844-9.
65. Ross, E.M., Farmacodinâmica: mecanismos de ação das drogas e relação entre concentração da droga e seu efeito, in *As bases farmacológicas da terapêutica*, P. Taylor, Editor, Guanabara & Koogan.
66. Davies, S.S., et al., Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 16015-23.

67. McIntyre, T.M., et al., Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(1): p. 131-6.
68. Nagy, L., et al., Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 229-40.
69. Kliewer, S.A., et al., A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, 1995. **83**(5): p. 813-9.
70. Pages, G., et al., LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **905**: p. 159-64.
71. Sano, T., et al., Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21197-206.
72. Silva, A.R., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol*, 2002. **168**(8): p. 4112-20.
73. Vasques, E., et al., Impairment of endothelium-dependent aorta relaxation by phospholipid components of oxidized low-density lipoprotein. *Endothelium*, 2006. **13**(1): p. 1-8.
74. de Assis, E.F., et al., Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 2090-8.
75. Marathe, G.K., et al., Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28395-404.
76. Bozza, P.T., et al., Pharmacological modulation of lipopolysaccharide-induced pleural eosinophilia in the rat; a role for a newly generated protein. *Eur J Pharmacol*, 1993. **248**(1): p. 41-7.
77. Zinman, B., PPAR gamma agonists in type 2 diabetes: how far have we come in 'preventing the inevitable'? A review of the metabolic effects of rosiglitazone. *Diabetes Obes Metab*, 2001. **3 Suppl 1**: p. S34-43.
78. Moller, D.E. and D.A. Greene, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists for diabetes. *Adv Protein Chem*, 2001. **56**: p. 181-212.

79. Tafazoli, S., J.S. Wright, and P.J. O'Brien, Prooxidant and antioxidant activity of vitamin E analogues and troglitazone. *Chem Res Toxicol*, 2005. **18**(10): p. 1567-74.
80. Bakhle, Y.S., COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**(6): p. 1137-50.
81. Campbell, S.E., et al., Comparative effects of RRR-alpha- and RRR-gamma-tocopherol on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 13.
82. Ulich, T.R., et al., The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol*, 1991. **138**(6): p. 1485-96.
83. Van Amersfoort, E.S., T.J. Van Berkel, and J. Kuiper, Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev*, 2003. **16**(3): p. 379-414.
84. Tobias, P.S., K. Soldau, and R.J. Ulevitch, Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*, 1986. **164**(3): p. 777-93.
85. Ramadori, G., et al., Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology*, 1990. **58**(2): p. 89-94.
86. Wright, S.D., et al., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
87. Tsan, M.F. and B. Gao, Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(3): p. 514-9.
88. Bozza, P.T., et al., Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol*, 1994. **270**(2-3): p. 143-9.
89. DeForge, L.E., et al., Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J Immunol*, 1992. **148**(7): p. 2133-41.
90. Zhou, Z., M.C. Connell, and D.J. Macewan, TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal*, 2007.
91. Pang, G., et al., GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol*, 1994. **96**(3): p. 437-43.

92. Kavelaars, A., et al., Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. *J Neuroimmunol*, 2005. **161**(1-2): p. 162-8.
93. Werz, O. and D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther*, 2006. **112**(3): p. 701-18.
94. Surette, M.E., et al., Lipopolysaccharides prime whole human blood and isolated neutrophils for the increased synthesis of 5-lipoxygenase products by enhancing arachidonic acid availability: involvement of the CD14 antigen. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1347-55.
95. Doerfler, M.E., et al., Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. *J Clin Invest*, 1989. **83**(3): p. 970-7.
96. Harada, A., et al., Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*, 1994. **56**(5): p. 559-64.
97. Larsen, C.G., et al., The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*, 1989. **243**(4897): p. 1464-6.
98. Strieter, R.M., et al., Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science*, 1989. **243**(4897): p. 1467-9.
99. Thornton, A.J., et al., Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol*, 1990. **144**(7): p. 2609-13.
100. Detmers, P.A., et al., Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*, 1990. **171**(4): p. 1155-62.
101. Hinz, B., K. Brune, and A. Pahl, 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(2): p. 415-20.
102. Maggi, L.B., Jr., et al., Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes*, 2000. **49**(3): p. 346-55.
103. Hong, G., et al., PPAR gamma-dependent anti-inflammatory action of rosiglitazone in human monocytes: suppression of TNF alpha secretion is not mediated by PTEN regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **303**(3): p. 782-7.
104. Uchimura, K., et al., Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells. *Hepatology*, 2001. **33**(1): p. 91-9.

105. Murch, O., M. Collin, and C. Thiemermann, Lysophosphatidic acid reduces the organ injury caused by endotoxemia—a role for G-protein-coupled receptors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Shock*, 2007. **27**(1): p. 48-54.
106. Zhang, X., et al., Differential regulation of chemokine gene expression by 15-deoxy-delta 12,14 prostaglandin J2. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7104-11.
107. Fu, Y., N. Luo, and M.F. Lopes-Virella, Upregulation of interleukin-8 expression by prostaglandin D2 metabolite 15-deoxy-delta12, 14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2) in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 2002. **160**(1): p. 11-20.
108. Jozkowicz, A., et al., Prostaglandin-J2 induces synthesis of interleukin-8 by endothelial cells in a PPAR-gamma-independent manner. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2001. **66**(3): p. 165-77.
109. Wu, D., M.G. Hayek, and S. Meydani, Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J Nutr*, 2001. **131**(2): p. 382S-8S.
110. Wu, D., et al., Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol*, 1998. **275**(3 Pt 1): p. C661-8.
111. Beharka, A.A., et al., Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*, 2002. **32**(6): p. 503-11.
112. van Tits, L.J., et al., alpha-tocopherol supplementation decreases production of superoxide and cytokines by leukocytes ex vivo in both normolipidemic and hypertriglyceridemic individuals. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(2): p. 458-64.
113. Cuschieri, J., et al., Vitamin E inhibits endotoxin-mediated transport of phosphatases to lipid rafts. *Shock*, 2007. **27**(1): p. 19-24.
114. Schock, B.C., et al., Enhanced inflammatory responses in alpha-tocopherol transfer protein null mice. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **423**(1): p. 162-9.
115. Mukherjee, R., et al., Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 8071-6.
116. Traber, M.G. and H.J. Kayden, Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr*, 1989. **49**(3): p. 517-26.
117. Devaraj, S., D. Li, and I. Jialal, The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest*, 1996. **98**(3): p. 756-63.

118. Devaraj, S., A. Harris, and I. Jialal, Modulation of monocyte-macrophage function with alpha-tocopherol: implications for atherosclerosis. *Nutr Rev*, 2002. **60**(1): p. 8-14.
119. Bozza, P.T., et al., Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1515-25.
120. Oquendo, P., et al., The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. *J Biol Chem*, 1989. **264**(7): p. 4133-7.
121. Lin, M., et al., CXCL1/KC and CXCL5/LIX are selectively produced by corneal fibroblasts and mediate neutrophil infiltration to the corneal stroma in LPS keratitis. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(3): p. 786-92.
122. Yu, S.F., T.J. Koerner, and D.O. Adams, Gene regulation in macrophage activation: differential regulation of genes encoding for tumor necrosis factor, interleukin-1, JE, and KC by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, 1990. **48**(5): p. 412-9.
123. Munteanu, A., et al., CD36 overexpression in ritonavir-treated THP-1 cells is reversed by alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med*, 2005. **38**(8): p. 1047-56.
124. Devaraj, S., I. Hugou, and I. Jialal, Alpha-tocopherol decreases CD36 expression in human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res*, 2001. **42**(4): p. 521-7.
125. Groskreutz, D. and E.T. Schenborn, Reporter systems. *Methods Mol Biol*, 1997. **63**: p. 11-30.
126. Schenborn, E. and D. Groskreutz, Reporter gene vectors and assays. *Mol Biotechnol*, 1999. **13**(1): p. 29-44.
127. Devaraj, S. and M.G. Traber, Gamma-tocopherol, the new vitamin E? *Am J Clin Nutr*, 2003. **77**(3): p. 530-1.
128. Bjorneboe, A., et al., Secretion of alpha-tocopherol from cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1987. **922**(2): p. 199-205.
129. Mardones, P. and A. Rigotti, Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *J Nutr Biochem*, 2004. **15**(5): p. 252-60.
130. Yasunaga, T., et al., Effect of vitamin E as an immunopotential agent for mice at optimal dosage and its toxicity at high dosage. *J Nutr*, 1982. **112**(6): p. 1075-84.

131. Higashi, K., et al., Interaction of protein phosphatases and ethanol on phospholipase C-mediated intracellular signal transduction processes in rat hepatocytes: role of protein kinase A. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996. **20**(9 Suppl): p. 320A-324A.
132. Debelak-Kragtorp, K.A., D.R. Armant, and S.M. Smith, Ethanol-induced cephalic apoptosis requires phospholipase C-dependent intracellular calcium signaling. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003. **27**(3): p. 515-23.
133. Miyamoto, K., et al., IL-8 is involved in homologous TNF alpha-, but not in IL-1 beta-induced neutrophil infiltration in rabbits. *Inflamm Res*, 1997. **46**(11): p. 472-7.
134. Yoshimura, T., et al., Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9233-7.
135. White, M.V., et al., Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol Lett*, 1989. **22**(2): p. 151-4.
136. Beutler, B., I.W. Milsark, and A.C. Cerami, Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 1985. **229**(4716): p. 869-71.
137. Udalova, I.A., et al., Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. *J Biol Chem*, 1998. **273**(33): p. 21178-86.
138. Shakhov, A.N., et al., Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med*, 1990. **171**(1): p. 35-47.
139. Vlahopoulos, S., et al., Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1878-89.
140. Rankin, J.A., et al., Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J Clin Invest*, 1990. **86**(5): p. 1556-64.
141. Boyault, S., et al., 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett*, 2001. **501**(1): p. 24-30.
142. Simonin, M.A., et al., PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(1): p. C125-33.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)