UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DAYSE SANTOS ARIMATEIA

INFLUÊNCIA DO TEMPO E DOSE DE HEPARINA EM MODELO DE PERITONITE AGUDA

NATAL
2011

DAYSE SANTOS ARIMATEIA

INFLUÊNCIA DO TEMPO E DOSE DE HEPARINA EM MODELO DE PERITONITE AGUDA

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Suely Ferreira Chavante.

NATAL
2011

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Arimateia, Dayse Santos.
Influência do tempo e dose de heparina em modelo de peritonite aguda / Dayse Santos Arimateia. – Natal, RN, 2011.

53 f. : Il.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Ferreira Chavante.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Heparina – Dissertação 2. Inflamação - Dissertação. 3. Leucócitos – Dissertação. I. Chavante, Suely Ferreira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB CDU 612.115

Dedico esta obra

Ao meu quarteto fantástico: meus amados pais, irmã e irmão. Responsáveis pela manutenção da minha sanidade;

À minha orientadora, Suely Ferreira Chavante, a força motriz, que sempre continuou acreditando mesmo nos momentos em que me senti esmorecer.

Viver é como andar de bicicleta: é preciso avançar para não perder o equilíbrio.
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ilda Paulino, por simplesmente ser a melhor mãe do mundo;

Ao meu pai, Humberto Arimatéia, muitas vezes tão sisudo, mas que na verdade é o maior dos corujas;

À minha irmã, Thayse Santos, o pilar humanístico, por seu apoio, valiosas conversas, músicas e leituras de Clarice;

Ao meu irmão, Humberto Júnior, o pilar tecnológico, tão carinhoso e atencioso, sempre disposto a me ajudar com meus problemas de *software* ou *bios*;

Aos meus padrinhos mágicos, tia Sônia e Moacir, sempre incentivadores e tão carinhosos;

Ao meu tio Carlinhos que, mesmo longe, sempre esteve muito perto;

À minha orientadora, Suely Chavante, por me receber em seu laboratório, pelas lições que aprendi para a vida acadêmica e para a vida;

À professora Fernanda Wanderley, pela confiança depositada em mim no início de minha vida científica, pessoa cuja presença sempre torna o ambiente mais leve;

À professora Giulianna Paiva, pelos ensinamentos bioquímicos, por sempre estar pronta para ajudar e responder minhas dúvidas;

À Adriana Brito, por suas importantes contribuições para esse trabalho, frutos de suas leituras e releituras criteriosas. Muito obrigada, mestre;

À Ana Katarina Menezes, por ter me acolhido quando cheguei ao Gags I e por sua preciosa amizade;

À Fernanda Azevedo, por sua amizade, por ter me ajudado tão de perto durante a finalização desse trabalho, por ficar acordada até tarde e acordar tão cedo nos dias de experimento, por ter ido tantas vezes comprar o almoço no paladar sertanejo, por ter me ajudado também na parte bibliográfica, *fotoshópica*, enfim... Você foi imprescindível;

À Raquel Brito, por sua amizade, por ter compartilhado comigo e Fernanda os finais de semana e noites tardes no laboratório, por ajudar durante a realização dos experimentos, por fornecer a *set list* do dia;

À Eliene, por sua amizade e alto astral contagiante;

Aos demais componentes do Laboratório de Glicoconjugados Bioativos I, prefiro não citar, pois houve aqueles que me viram chegar e eu vi saírem, os que eu vi chegar e sair, e os que eu vi chegar e que permanecem! Certamente, todos tiveram participação importante durante meus anos de aprendizado. Sou grata, simplesmente, muito grata;

Aos bons frutos oriundos da graduação, minhas amadas amigas Pandetes: Ana Katarina (Koka), Bibiana Araújo (Bibi), Dayse Cunha (Carolângela), Myrian Júlia (MJ), Priscila Mendonça (Centrada) e Tássia Lima (Tazinha). Por sua amizade, por me fazerem sorrir;

À Ana Katarina (Koka), por ter estado tão perto durante os momentos finais desse trabalho, por compartilhar comigo as agonias do final do mestrado, passar por isso juntas afinou ainda mais nossa amizade! Muito obrigada;

À Dayse Cunha, por sua amizade incondicional, por ter compartilhado as responsabilidades do mestrado em bioquímica durante as disciplinas. Por ter me ajudado durante a fase de realização de experimentos. Pelas correções iniciais do meu manuscrito. Muito obrigada, honey;

À minha turma de mestrado, pessoas que compartilharam comigo as agonias, as alegrias e os objetivos;

Às queridinhas, Larissa Lira e Nathália Araújo, pessoas especiais que tive a felicidade de conhecer durante o mestrado, são amizades que ficaram e ficarão;

À minha *fine veninde*, Sine Lund, cuja presença distante sempre encheu minha vida de cor e música nos momentos mais necessários;

À minha companheira de trabalho, Alessandra Marinho, peça importante para que eu seguisse em frente, sempre otimista e incentivadora. Sem você teria sido muito mais difícil conciliar a vida de estudante e profissional. Muito obrigada;

Às professoras que fizeram parte de minha pré-qualificação: Edda Leite e Selma Jerônimo, por suas preciosas contribuições, vocês deram o fôlego pra ir adiante;

Aos professores que fizeram parte da minha qualificação: Aurigena Antunes, Daniella Martins e João Paulo Matos. Pessoas que foram incríveis, que se mostraram muito solícitos e dispostos não apenas a fazer observações, mas efetivamente me ajudaram, sou extremamente grata! Vocês são grandes professores;

À Margarita Mavromatis, por sempre ter sido tão gentil comigo, tendo, inclusive, disponibilizado seu tempo para me levar até o Departamento de Material e Patrimônio da UFRN para buscar um material de laboratório;

A Rogério, por sempre ter me tratado tão bem e sempre ter se mostrado disposto a me ajudar quando precisei. Sua calma é contagiante, gostaria de ser um pouco como você;

A Jonas e Ângela, pela cordialidade, pela ajuda na hora precisa, pelo café que certamente foi meu combustível durante o mestrado;

Aos funcionários do DBq: Creuza, Itamar, Marcos e Ricardo. Por sempre terem me tratado com toda a cordialidade;

A todos os professores do departamento de Bioquímica da UFRN: seja por terem me ensinado os princípios da bioquímica, seja por me socorrerem em momentos de dúvida, seja por me permitirem utilizar equipamentos em seus laboratórios, seja por sua simpatia ou um simples “bom dia” no corredor, fazendo com que eu me sentisse bem vinda no departamento;

A todos os demais Mestrandos, aos ICs e Doutorandos do departamento de bioquímica, pessoas que em algum momento certamente precisei durante minha vida no DBq-UFRN, não tenho como expressar toda a gratidão;

À CAPES pela bolsa concedida;

Por último e mais importante, agradeço ao Pai Celestial. Por colocar na minha vida todas essas pessoas maravilhosas que citei aqui, por me ajudar a recuperar o equilíbrio quando eu vacilei, por ser a força invisível que me fez levantar cedo e dormir tarde tantas e quantas tantas vezes fossem necessárias para chegar ao meu objetivo!

Sometimes the fastest way to get there is to go slow
And sometimes if you wanna hold on you got to let go.
Tina Dickow

RESUMO

Nos últimos anos, a heparina vem sendo alvo de vários estudos relacionados à inflamação, devido sua capacidade de se ligar a diversas proteínas envolvidas com a resposta imune. Recentemente, em nosso laboratório, foi demonstrada, em modelo de peritonite induzida por tioglicolato, a capacidade da heparina em reduzir o influxo celular à cavidade peritoneal, 3 horas após o estímulo inflamatório. No presente trabalho, utilizando o mesmo modelo, foi avaliada a capacidade da heparina em interferir na infiltração leucocitária após 8 horas da indução da inflamação, momento em que a infiltração neutrofílica é máxima. Utilizando contagem diferencial celular, avaliou-se a influência da heparina sobre as populações celulares envolvidas na inflamação. Oito horas após o estímulo inflamatório, apenas a dosagem de heparina de 1 µg/Kg, manteve a capacidade de interferir na migração leucocitária, apresentando 62,8% de diminuição ($p < 0,001$) no influxo celular, quando comparada ao controle positivo. Enquanto para a dosagem de heparina de 15 µg/Kg foi observado efeito pró-inflamatório no sangue total verificado pelos aumentos de 60,9% ($p < 0,001$) e 117,8% ($p < 0,001$) na proporção de neutrófilos e monócitos, respectivamente, em comparação ao controle positivo. Além disso, essa dosagem também apresentou proporção neutrofílica no líquido peritoneal 27,3% maior que o controle positivo ($p < 0,05$). Essa dualidade entre efeitos anti- e pró-inflamatório nos diferentes tempos e doses analisados corroboram dados da literatura que atribuem à heparina um papel como imunomodulador pleiotrópico.

Palavras-chave: Inflamação. Heparina. Peritonite. Leucócitos.

ABSTRACT

In the last years, heparin has become target of many studies related to inflammation due its ability of biding to proteins involved on immune response. Recently, it was demonstrated, at our laboratory, using a thIoglycollate-induced peritonitis model, heparin's capacity of reduce cellular influx into the peritoneal cavity, 3 hours after the inflammatory stimulus. Once neutrophilic infiltration is highest around 8 hours after the inflammatory stimulus, at the present work, using the same peritonitis model, it was assessed heparin's ability of keeping the interference on leukocyte infiltration, 8 hours after inflammation induction. Moreover, using cellular differential count, it was evaluated how the cellular populations involved in the inflammatory process would be affected by the treatment. Eight hours after the inflammatory stimulus, only heparin dosage of 1 µg/Kg was able to reduce the cellular influx to peritoneum, 62.8% of reduction when compared to positive control ($p < 0.001$). Furthermore, heparin dosage of 15 µg/Kg presented a pro-inflammatory effect in whole blood verified by the increase of 60.9% ($p < 0.001$) and 117.8% ($p < 0.001$) on neutrophils and monocytes proportion, respectively, when compared to positive control. In addition, this dosage also presented a neutrophilic proportion on peritoneal fluid 27.3% higher than positive control ($p < 0.05$). This duality between anti- and pro-inflammatory effects at different times corroborates studies that attribute a pleiotropic immunomodulator role to heparin.

Key-words: Inflammation. Heparin. Peritonitis. Leukocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Recrutamento de leucócitos 15
FIGURA 2 Estrutura da heparina 18
FIGURA 3 Os ratos Wistar 23
QUADRO 1: Distribuição dos grupos de estudo segundo o tratamento. 25
FIGURA 4 Desenho esquemático da peritonite induzida por tioglicolato de sódio....25
FIGURA 5 Contagem total de células em câmara de Neubauer 26
FIGURA 6 Cálculo para o número total de leucócitos em câmara de Neubauer.....27
FIGURA 7 Preparação do esfregaço.....28
FIGURA 8 Aspecto morfológico dos principais leucócitos encontrados no sangue periférico de ratos da linhagem Wistar. 29
FIGURA 9 Efeito da heparina sobre o influxo de células para a cavidade peritoneal30
FIGURA 10 Porcentagens de neutrófilos no sangue total.....31
FIGURA 11 Porcentagens de linfócitos no sangue total 32
FIGURA 12 Porcentagens de monócitos no sangue total 33
FIGURA 13 Porcentagens de neutrófilos no líquido peritoneal 34
FIGURA 14 Porcentagens de linfócitos no líquido peritoneal.. 35
FIGURA 15 Porcentagens de macrófagos no líquido peritoneal.. 36
FIGURA 16 Porcentagens de eosinófilos no líquido peritoneal.. 37

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AT	Antitrombina
CD	Classe de diferenciação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAGs	Glicosaminoglicanos
Glc	Glucosamina
GlcA	Ácido glucurônico
GlcNS6S	Glucosamina N,6-O-sulfatada
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
i.p.	Intra-peritoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IdoA	Ácido L-idurônico
IdoA2S	Ácido L-idurônico 2-O-sulfato
IL	Interleucina
LFA-1	Antígeno associado à função do leucócito-1
LP	Líquido peritoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
Mac-1	Antígeno de macrófago-1
NAc	Acetilação na posição N
NF-κB	Fator nuclear κB
NS	Sulfatação na posição N
PECAM-1	Molécula-1 de adesão celular endotelial à plaquetas
PSGL1	Gliproteína ligante de P-selectina 1
PGN	Peptidoglicano
P^-/I^-	Camundongos mutantes deficientes em P-selectina e ICAM-1
RPM	Rotações por minuto
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão à célula vascular-1

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 14
1.1. INFLAMAÇÃO 14
1.2. HEPARINA E INFLAMAÇÃO 17
1.2.1. **Peritonite** 20
2. **OBJETIVOS** 22
2.1. OBJETIVO GERAL 22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
3. **MATERIAIS E MÉTODOS** 23
3.1. ANIMAIS 23
3.2. HEPARINA 23
3.3. TRATAMENTO 23
3.4. PERITONITE AGUDA INDUZIDA POR TIOGLICOLATO DE SÓDIO 24
3.5. OBTENÇÃO E CONTAGEM TOTAL DAS CÉLULAS DO LÍQUIDO PERITONEAL 25
3.6. CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO LÍQUIDO PERITONEAL E SANGUE TOTAL 27
3.7. EQUIPAMENTOS 29
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 29
4. **RESULTADOS** 30
4.1. EFEITO DA HEPARINA SOBRE O INFLUXO DE CÉLULAS À CAVIDADE PERITONEAL 30
4.2. AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO SANGUE TOTAL 31
4.2.1. **Neutrófilos** 31
4.2.2. **Linfócitos** 31
4.2.3. **Monócitos** 32
4.3. AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO LÍQUIDO PERITONEAL 33
4.3.1. **Neutrófilos** 33
4.3.2. **Linfócitos** 34
4.3.3. **Macrófagos** 35
4.3.4. **Eosinófilos** 36
5. **DISCUSSÃO** 38

6. **CONCLUSÕES** 44
REFERÊNCIAS 45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é um conjunto complexo de interações entre células e fatores solúveis, que pode surgir em qualquer tecido como resposta a um dano traumático, infeccioso, pós-isquêmico, tóxico ou autoimune (NATHAN, 2002). Esse processo é importante para remoção de micróbios ou irritantes e para potencializar o reparo tecidual; normalmente, promovendo recuperação e cura (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; NATHAN, 2002). Sendo assim, o papel da inflamação envolve tanto a defesa do organismo, quanto o processo de reparo tecidual, após a remoção do agente agressor.

Uma característica essencial de qualquer resposta inflamatória é o recrutamento rápido de leucócitos do sangue para o sítio de inflamação (MULLER, 2003; YADAV et al., 2003). Esse processo de recrutamento no qual os leucócitos migram através do endotélio até os tecidos é conhecido como extravasamento ou diapedese, e compreende os seguintes passos: ligação inicial e rolamento dos leucócitos no endotélio inflamado, ativação dos leucócitos por citocinas associadas ao endotélio, firme aderência à parede vascular, degradação da membrana basal e migração dos leucócitos para o sítio de inflamação por meio de um gradiente de quimiocinas (Figura 1). Uma vez no tecido alvo, essas células podem desempenhar atividades imunológicas, tais como a eliminação do patógeno e reparo tecidual (PARISH, 2006; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A fraca ligação inicial e o rolamento dos leucócitos pelo endotélio envolvem lectinas denominadas P-, L- e E-selectinas e seus ligantes (moléculas contendo carboidratos relacionados com o sialil Lewis^{x}) (LOWE, 2003; VARKI, 1994; ROSEN; BERTOZZI, 1994). A P-selectina é rapidamente mobilizada para a superfície de células endoteliais expostas à trombina, histamina ou fator de necrose tumoral (TNF), sua interação com a glicoproteína ligante de P-selectina 1 (PSGL1), provavelmente, inicia o processo de rolamento no endotélio. A L-selectina é expressa constitutivamente pelos leucócitos circulantes e interage com o heparam sulfato presente na superfície endotelial. A E-selectina, por sua vez, é induzida especificamente em células endoteliais algumas horas após sua ativação por

citocinas como Interleucina-1 (IL-1) e o TNF (PARISH, 2006; WANG, 2002). Como resultado dessa fraca interação entre selectinas e seus ligantes, os leucócitos repetitivamente se destacam e se ligam novamente e assim rolam ao longo da superfície endotelial. Durante o rolamento, ocorre diminuição da velocidade dos leucócitos, permitindo que estímulos atuem sobre eles (ROT; ADRIAN, 2004).

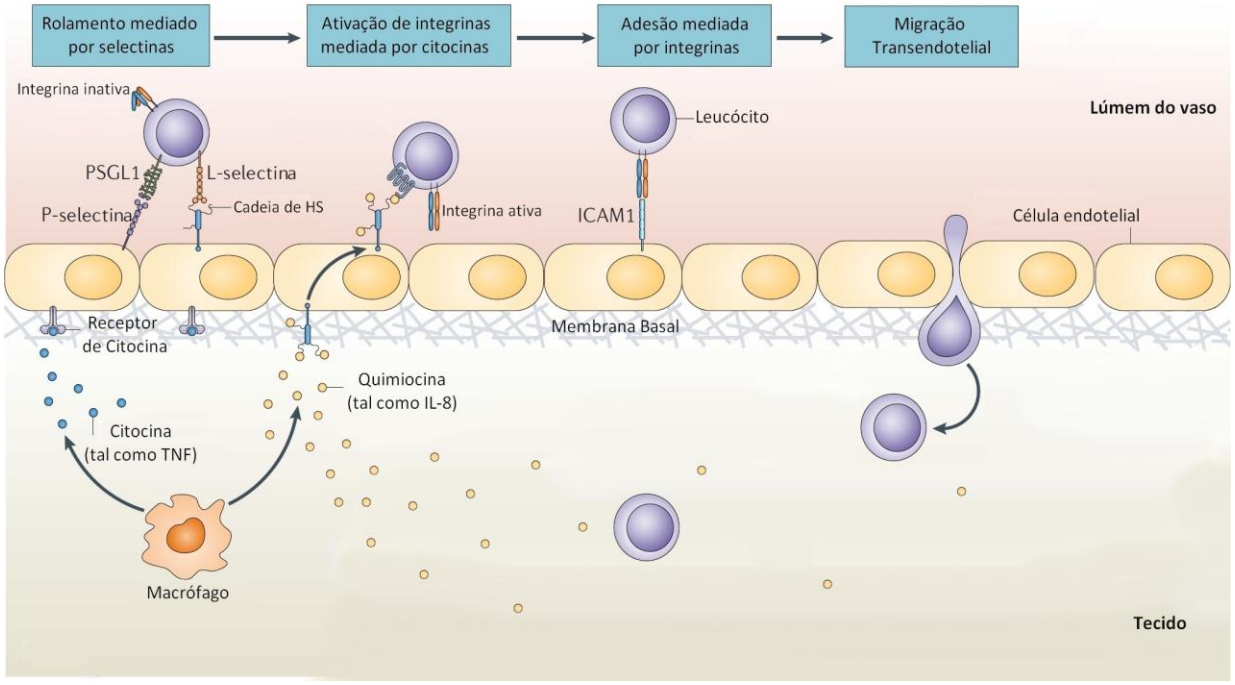

Figura 1- Recrutamento de leucócitos. Em locais de infecção, a produção de citocinas (tais como TNF e IL-1), por macrófagos residentes, ativa as células endoteliais e leva à expressão de selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas. As selectinas medeiam os eventos iniciais de interação com o endotélio; as intregrinas medeiam a forte a adesão dos leucócitos por meio de interações com moléculas ligantes de integrinas tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1); as quimiocinas aumentam a afinidade das integrinas dos leucócitos e estimulam a migração das células para os locais de infecção. Todos os leucócitos ativados utilizam essencialmente os mesmos mecanismos de migração. (Adaptado de PARISH, 2006). PSGL1, glicoproteína ligante de P-selectina 1.

TNF e IL-1 são citocinas secretadas por macrófagos, mastócitos e células endoteliais que, além de estimularem a expressão de P- e E-selectina, induzem a expressão endotelial de ligantes para integrinas (principalmente VCAM-1 e ICAM-1), moléculas envolvidas com o evento seguinte do recrutamento celular: ativação dos leucócitos e firme aderência ao endotélio. Os leucócitos normalmente expressam integrinas em estado de baixa afinidade; as citocinas produzidas no local de infecção interagem com proteoglicanos de heparam sulfato e são transportadas para a superfície luminal das células endoteliais (PARISH, 2006; JOHNSTON; BUTCHER, 2002). Essas citocinas agem nos leucócitos que estão rolando, ativando-os e

causando a conversão de suas integrinas (tais como LFA-1 e Mac-1) para um estado de alta afinidade. Essa conversão ocorre devido a alterações conformacionais nos domínios extracelulares de ligação (SHAMRI et al., 2005). A combinação da indução da expressão de ligantes de integrinas no endotélio e a ativação das integrinas nos leucócitos resultam em sua firme aderência ao mesmo.

Após a aderência, os leucócitos ativados atravessam a superfície vascular (NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005; MULLER, 2003;), utilizando a molécula de adesão PECAM-1 e a ação de enzimas que degradam a membrana basal, como metaloproteinases, heparanase e elastase (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; YADAV et al., 2003; PARISH et al., 1998; DELCAUX et al., 1996).

Além dos mecanismos já mencionados, neutrófilos e outros leucócitos também necessitam de quimioatraentes para facilitar sua migração para sítios de dano tecidual ou infecção. Quimioatraentes são moléculas solúveis tais como produtos bacterianos, componentes do sistema complemento e citocinas (quimiocinas). Muitos quimioatraentes são específicos para subgrupos de leucócitos e podem ser classificados com base em sua especificidade (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Com relação às quimiocinas, duas das quatro famílias que as compõem têm sido extensivamente descritas: famílias alfa e beta (LUSTER, 1998).

As alfa quimiocinas agem em conjunto com as beta quimiocinas e citocinas para mediar a resposta pró-inflamatória à injúria e infecção (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Na família das alfa quimiocinas está a interleucina-8 (IL-8), um potente quimioatraente para neutrófilos, enquanto as beta quimiocinas são quimioatraentes para uma variedade de leucócitos, incluindo basófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A produção local de quimiocinas se torna acentuada em casos de dano ou invasão tissular, causando um recrutamento seletivo de leucócitos para o sítio de injúria. A característica do infiltrado celular é determinada pelo perfil de quimiocinas induzidas por determinada doença ou processo inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004), e é importante na classificação do tipo de inflamação.

No caso da inflamação aguda, seu infiltrado é predominantemente composto por neutrófilos. Esse tipo de inflamação se caracteriza ainda por sua duração de curto período (horas a dias), vasodilatação e exsudação de plasma (SPLETTSTOESSER; SCHUFF-WERNER, 2002). As primeiras células que migram

pelo endotélio são os neutrófilos (entre 4-12 horas), seguidos pelos monócitos, que após ativação tecidual se tornam macrófagos (entre 24-48 horas), e linfócitos (48-96 horas) (BALESTIERI, 2006).

O recrutamento de leucócitos do sangue e sistema linfático para os tecidos é, sem dúvida, extremamente importante, pois facilita a resposta do hospedeiro à lesão tecidual e a invasão por patógenos. Entretanto, quando esse processo se torna descontrolado pode contribuir para a fisiopatologia de doenças inflamatórias agudas e crônicas (WANG et al., 2002). A ativação excessiva de leucócitos leva a sua agregação e liberação de radicais tóxicos do oxigênio e enzimas proteolíticas que, por sua vez, contribuem para dano vascular e tecidual (YOUNG, 2008). Substâncias com capacidade de inibir esses eventos têm potencial para seu uso no tratamento de doenças onde exista vasto exsudato inflamatório (JONES et al., 2002). Dentro desse contexto, nos últimos anos a heparina tem sido alvo de diversos estudos sobre suas propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição do recrutamento de leucócitos (TYRRELL et al., 1999).

1.2. Heparina e inflamação

A heparina é uma molécula com alto grau de sulfatação pertencente à família de polissacarídeos chamados glicosaminoglicanos (GAGs). Sua estrutura química é caracterizada pela presença de unidades dissacarídicas α(1-4) ligadas nas quais se alternam uma glucosamina (Glc) e um açúcar não aminado (ácido urônico). O grupamento amino no carbono 2 da glucosamina pode ser substituído por um grupo acetil (NAc) ou sulfato (NS); além disso, suas posições 3-O e 6-O podem apresentar-se com ou sem grupamento sulfato. O ácido urônico de cada unidade dissacarídica repetida pode ser tanto o ácido L-idurônico (IdoA) ou D-glucurônico (GlcA), os quais podem conter o grupamento sulfato na posição 2-O (LINHARDT, 2003 SUGAHARA; KITAGAWA, 2002; GUNAY; LINHARDT, 1999). A heparina é composta em sua maior parte (75-95%) por um dissacarídeo trissulfatado (→4]IdoA2S(1→4)GlcNS6S[1→) (Figura 2A), sendo o restante da molécula composta por estruturas dissacarídicas chamadas de sequências variáveis (Figura 2B) (PERVIN et al., 1995; LOGANATHAN et al., 1990; LINHARDT et al., 1988). As moléculas de heparina são geralmente isoladas a partir de vísceras de bovinos e suínos e compreendem uma mistura heterogênea de polímeros com massa

molecular variando de 2.000 a 40.000 Da (NADER et al., 2004; PAVÃO, 2002; JOHNSON; MULLOY, 1976).

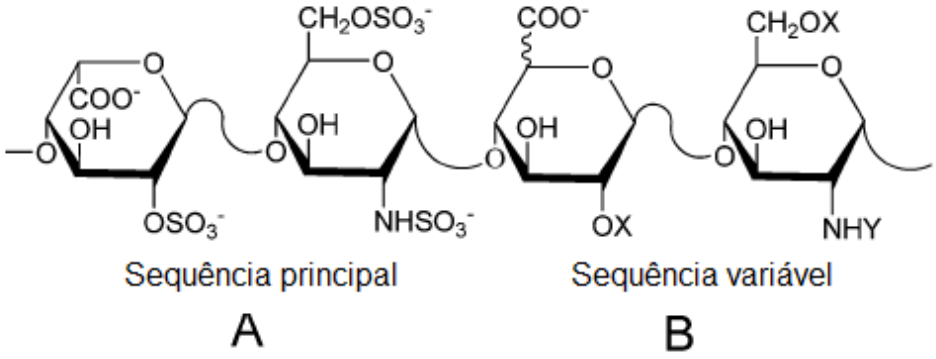

Figura 2- Estrutura da heparina. Adaptada de LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009.

Desde sua descoberta, em 1916, até os dias de hoje, a heparina permanece como um dos mais importantes fármacos anticoagulantes na prática clínica (YOUNG, 2008; HIRSH et al., 2001). Tendo sido o primeiro composto utilizado como agente anticoagulante e antitrombótico (NADER et al., 2001). Isso se deve à sua capacidade de se ligar com alta afinidade à antitrombina (ATIII), promovendo uma mudança conformacional nesta proteína responsável por um aumento, de até 1000 vezes, na taxa de inibição da trombina e dos fatores Xa e IXa da cascata de coagulação (NADER et al., 2001; JORDON et al., 1980).

Além de sua ligação de alta afinidade com a ATIII via uma sequência pentassacarídica específica (LINDAHL, 1984), a heparina, devido sua natureza altamente aniônica, também é capaz de se ligar a diversas proteínas (CONRAD, 1998), incluindo fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios e mediadores da resposta imune (YOUNG, 2008). Um número cada vez maior de evidências tem mostrado que a heparina pode afetar a resposta imune, exibindo tanto efeitos anti- quanto pró-inflamatórios (HOCHART et al., 2008). Por essa razão, essa molécula vem sendo cada vez mais referida como um imunomodulador pleiotrópico (HEINZELMANN, 1999; FREEDMAN, 1992), ou seja, com a capacidade de atuar na inflamação apresentando diferentes efeitos.

Entre os efeitos anti-inflamatórios da heparina descritos até hoje, estão sua capacidade de afetar a interação dos leucócitos com o endotélio vascular, tanto *in vitro* (SMAILBEGOVIC et al., 2001; LEVER et al., 2000; SILVESTRO et al., 1994) quanto *in vivo* (LEVER, 2010; SALAS et al., 2000; XIE et al., 1997; LEY et al., 1991)

e inibir o acúmulo de células inflamatórias nos tecidos (BELMIRO et al., 2009; BRITO et al., 2008; SEEDS; PAGE, 2001; VANCHERI et al., 2001). Essa molécula tem demonstrado efeitos estratégicos em vários processos durante a migração celular inflamatória, tais como adesão, ativação e deslocamento de leucócitos (PAPA et al., 2000).

Vários estudos relatam que heparina e heparam sulfato (outro membro da família dos GAGs) podem ser reconhecidos por L- e P-selectina (HAYWARD et al., 1997) e inibir a ligação dessas moléculas ao sialil Lewis^{x} (KOENIG et al., 1998; NORGARD-SUMNICHT et al., 1995; NELSON et al., 1993; SKINNER et al*.,* 1991), impedindo, assim, a fraca adesão inicial dos leucócitos ao endotélio. A heparina se mostrou capaz ainda de reduzir a expressão endotelial de ICAM-1 e de se ligar à integrina Mac-1, as quais desempenham um papel crucial no estabelecimento de uma adesão estável do leucócito ao endotélio (PERRETTI; PAGE, 2000; MILLER et al., 1998;). Outros estudos mostram a capacidade da heparina de inibir a interação entre neutrófilos e IL-8, impedindo a resposta quimiotática dessas células (RAMDIN et al., 1998). Além disso, ela dificulta a diapedese pela inibição da elastase de neutrófilos, seja por ligação direta à enzima ou por inibição da liberação da mesma (BROWN et al., 2003; WALSH et al., 1991).

Existem evidências de que a heparina e compostos relacionados também possam exercer seus efeitos anti-inflamatórios através do fator de transcrição NF-κB (YOUNG, 2008). Esse fator de transcrição é ativado por um vasto número de agentes, incluindo citocinas, lipopolissacarídeo (LPS), radiação UV, fatores de crescimento, estresse oxidativo e infecção viral (PAPARELLA et al., 2002). Os genes regulados por ele são diversos, incluindo aqueles que promovem a transcrição de vários genes envolvidos na resposta imune, como os que levam a expressão de ICAM-1, L- e P-selectinas, IL-6 e 8 e TNF-α (CRAIG et al., 2000; GWECHENBERGER et al., 1999; YAMASAKI et al., 1993;). Uma vez internalizada para o citoplasma, a heparina e outras moléculas relacionadas podem se ligar eletrostaticamente à sequência de translocação nuclear positivamente carregada do NF-κB, impedindo assim sua ação (YOUNG, 2008).

Com relação a efeitos pró-inflamatórios, trabalhos mostram que a heparina é capaz de aumentar a liberação de TNF-α por monócitos isolados de sangue humano e ativados por LPS (HEINZELMANN et al., 1999; ENGSTAD et al., 1997). Esse comportamento foi observado tanto em experimentos realizados com monócitos

isolados e tratados por 24 horas com LPS e heparina, quanto para tratamento direto do sangue total por 6 horas (HEINZELMANN et al., 1999). Dados da literatura demonstram que em experimentos com sangue total, a heparina ocasionou um aumento na secreção de IL-8 por monócitos ativados com LPS, ácido lipoteicóico (LTA) ou peptidoglicano (PGN) (HEINZELMANN; BOSSHART, 2005). Recentes estudos, também realizados com ativação de monócitos por LPS no sangue total, relatam ainda a capacidade da heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular (HBPM) em promover um efeito pró-inflamatório devido ao aumento da secreção de IL-1β e IL-8, em contraste com efeitos anti-inflamatórios observados sob condições *serum-free* (HOCHART et al., 2008).

Tanto LPS, quando o LTA e o PGN ativam monócitos por meio de ligação a um receptor de membrana (CD14), o que induz a ativação de diversos genes e substâncias bioativas tais como citocinas, proteínas adesivas e enzimas (HERMANN et al., 2002; DZIARSKI et al., 1998; ULEVITCH et al., 1995; RIETSCHEL et al., 1994). Os mecanismos pelos quais a heparina causa aumento da liberação de citocinas não são esclarecidos. Entretanto, diferentes autores especulam se esses efeitos podem ser causados pela ligação da heparina à superfície da membrana celular ou sua internalização, causando aumento da cascata de sinalização induzida por LPS (HEINZELMANN et al., 1999).

Duas das citocinas cuja expressão mostrou ser aumentada pela heparina, são as principais participantes do processo inflamatório. Produzidas principalmente por monócitos ativados, TNF-α e IL-1β são responsáveis, além da indução de moléculas de adesão e produção de quimiocinas por células endoteliais e macrófagos, por estimular a síntese de reagentes da fase aguda no fígado e pelos efeitos sistêmicos da inflamação, como a febre (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Entre as quimiocinas induzidas por TNF-α e IL-1β destaca-se a IL-8, importante para a ativação e quimiotaxia de neutrófilos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

1.2.1. Peritonite

A infiltração neutrofílica é um dos componentes celulares críticos na resposta inflamatória durante a peritonite (CROCKETT et al., 2004). Estudos utilizando modelos de peritonite aguda induzida por tioglicolato têm demonstrado a eficácia da

heparina e oligossacarídeos relacionados na inibição do processo de recrutamento leucocitário durante esse tipo de resposta inflamatória (WANG et al., 2002; XIE et al., 2000; NELSON et al., 1993). Além deles, um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, avaliou por meio desse mesmo modelo de peritonite aguda, o efeito de um composto tipo heparina sobre a migração leucocitária; para isso, foi utilizada heparina padrão como referência, a qual reduziu em mais de 80% a infiltração leucocitária à cavidade peritoneal na dose de 5 µg/Kg de animal (BRITO et al., 2008). Uma característica em comum nesses trabalhos é que todos eles tiveram um tempo de inflamação de 2-3 horas.

Considerando que os mecanismos responsáveis pela infiltração neutrofílica com um curto período de inflamação são diferentes daqueles associados a um período mais longo de lesão (HARLAN; WINN, 2002) e que a migração dessas células é máxima por volta de 8 horas após o estímulo inflamatório (HARTT et al., 1999; LAGASSE; WEISSMAN, 1996), procurou-se avaliar a capacidade da heparina de interferir sobre o influxo leucocitário após um período maior de inflamação. Além disso, em virtude da escassez de dados na literatura sobre o efeito da heparina no perfil leucocitário, procurou-se compreender de que forma o tratamento com esse fármaco pode influenciar as populações celulares envolvidas no evento inflamatório peritoneal em ratos da linhagem Wistar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar o efeito da heparina sobre a migração leucocitária, 8 horas após indução da inflamação, utilizando um modelo de peritonite aguda induzida por Tioglicolato de sódio 3%, em ratos da linhagem Wistar.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o nível de infiltração leucocitária na cavidade peritoneal dos animais, 8 horas após a indução da inflamação;

- Comparar o efeito da heparina sobre o recrutamento de leucócitos ao peritônio com os dados previamente obtidos com 3 horas de inflamação;

- Avaliar a influência da heparina sobre as populações celulares no sangue total e líquido peritoneal dos animais, 8 horas após indução da inflamação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos da linhagem Wistar (Figura 3) (fêmeas com 8 semanas de idade), provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), foram mantidos com livre acesso à água e alimentos. O manejo experimental realizado nesse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da mesma Universidade (Protocolo Nº: A-005/08).

Figura 3- Os ratos Wistar são uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus* desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia. Esta linhagem foi a primeira a ser utilizada como organismo modelo em uma época em que pesquisadores utilizavam primariamente camundongos da espécie *Mus musculus*. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO>. Acesso em: 03 fev 2011.

3.2. Heparina

Heparina sódica de mucosa suína obtida do Laboratório Derivati Organici (Trino Vercellese, Itália). Peso molecular de 16,5 KDa e 190 UI/mg (BISIO et al., 2001).

3.3. Tratamento

As doses de heparina utilizadas nesse estudo (em µg/Kg) foram selecionadas com base em um estudo anterior (BRITO et al., 2008). Para o cálculo da dosagem de diclofenaco de sódio (Voltaren®, Novartis) a ser administrada (em mg/Kg), empregou-se o método de extrapolação alométrica interespecífica, conforme proposto por Pachaly & Brito (2000). A extrapolação alométrica permite, através do conhecimento das taxas metabólicas de dois diferentes vertebrados, extrapolar

matematicamente para cada um deles, doses de medicamentos indicadas para o outro, para o qual já foram feitos estudos laboratoriais de experimentação farmacocinética e farmacodinâmica (PACHALY; BRITO, 2000).

As soluções de heparina, diclofenaco de sódio e solução salina apirogênica 0,9%, a serem administradas subcutaneamente, foram colocadas em seringas com capacidade para 1 mL. A solução de tioglicolato de sódio (Sigma-Aldrich) 3% (autoclavada) e a solução salina, a serem administradas intraperitonealmente, foram colocadas em seringas de 5 mL. Todo o manejo das soluções injetadas nos animais foi realizado em capela de fluxo laminar, a fim de se evitar contaminação por agentes externos.

3.4. Peritonite aguda induzida por Tioglicolato de Sódio

Grupos formados por 5 a 7 animais foram distribuídos, segundo o tratamento, da seguinte maneira: 1) salina; 2) controle positivo; 3) animais tratados com diclofenaco de sódio (dosagem média de 4,6 mg/Kg); 4, 5 e 6) animais tratados com heparina nas doses de 1, 5 ou 15 µg/Kg de animal, respectivamente (Quadro 1). Cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 500 µL, contendo a dosagem de tratamento determinada para cada grupo, o veículo utilizado foi solução salina estéril 0,9%; o grupo salina e o controle positivo, receberam injeções subcutâneas contendo apenas salina. Após 30 minutos do tratamento subcutâneo, os animais receberam, intraperitonalmente, 2 mL de uma solução de tioglicolato de sódio 3%, a qual é responsável por uma inflamação aguda na cavidade peritoneal com a infiltração de neutrófilos (FRENETTE et al., 1996; MULLIGAN et al.,1993; NELSON et al., 1993). O grupo controle negativo recebeu intraperitonealmente 2 mL de salina. O modelo de peritonite aguda realizado nesse trabalho foi adaptado a partir de metodologia proposta por Xie et al. (2000). Cada ensaio correspondente a um determinado grupo foi realizado, pelo menos, duas vezes em momentos independentes.

Grupos	Tratamento subcutâneo	Estímulo intraperitoneal
Salina	500 µL Salina 0,9%	2 mL Salina 0,9%
Controle positivo		2mL Tioglicolato 3%
Diclofenaco	500 µL (4,6 mg/Kg)	
Heparina 1	500 µL heparina (1 µg/Kg)	
Heparina 5	500 µL heparina (5 µg/Kg)	
Heparina 15	500 µL heparina (15 µg/Kg)	

Quadro 1: Distribuição dos grupos de estudo segundo o tratamento.

3.5. Obtenção e contagem total das células do líquido peritoneal

Oito horas após a indução do estímulo inflamatório com tioglicolato, os animais foram eutanasiados e suas cavidades abdominais lavadas com 10 mL de solução salina. Após a lavagem, 4 mL do lavado foram retirados e acondicionados em tubos com EDTA, que foram mantidos em banho de gelo. O líquido coletado foi denominado de líquido peritoneal (LP) (Figura 4).

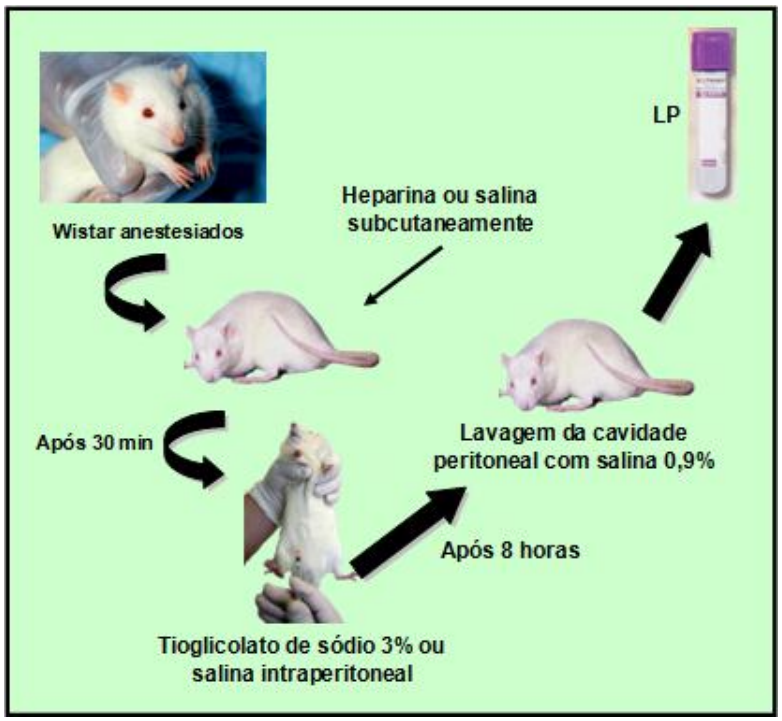

Figura 4- Desenho esquemático da peritonite induzida por tioglicolato de sódio. LP – Líquido peritoneal.

Para a contagem do número total de células presentes no LP, o líquido coletado foi transferido para tubos do tipo Falcon® com capacidade para 15 mL e centrifugado a 405 x g, 4°C por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 500 µL de solução salina; 20 µL de cada amostra foram diluídos em 380 µL (1:20) de solução de Turk (ácido acético a 3%). Com auxílio de um pipetador automático, a amostra diluída foi inserida na câmara de Neubauer de modo a preencher todo o espaço contido entre a superfície espelhada da mesma e a lamínula. Após aproximadamente 2 minutos, tempo para sedimentação das células, a contagem foi realizada, em objetiva de 40x (aumento total de 400x), nos quatro espaços destinados à contagem de leucócitos (Figura 5). Durante todo o processo de contagem as células foram mantidas em temperatura de 4 a 8°C.

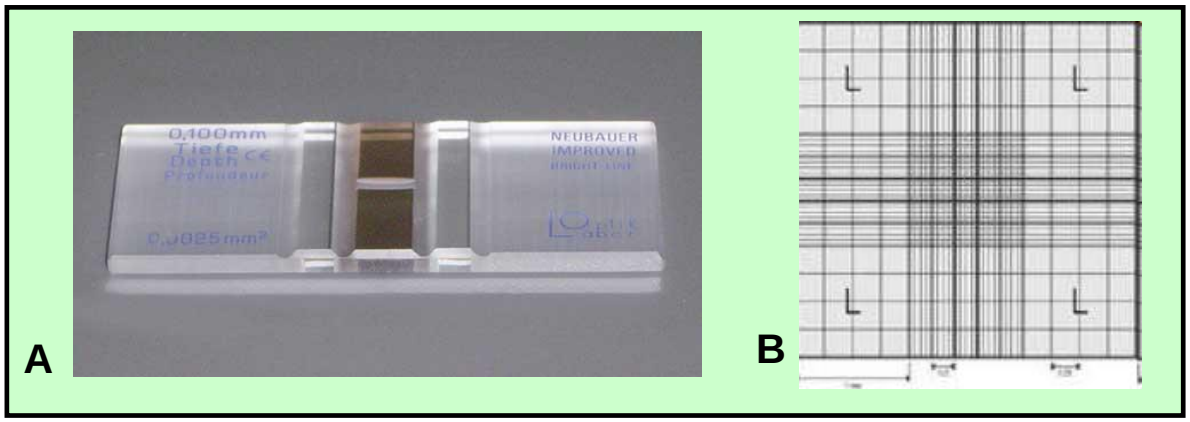

Figura 5- Contagem total de células em câmara de Neubauer. **A**. Câmara de Neubauer espelhada. Disponível em: <http://www.ciencor.com.br/catalogo/paginas/camarasparacontagem1.htm>. **B**. Espaços destinados a contagem total de leucócitos, identificados com "L". Disponível em: <http://www.pro-analise.com.br/produtos/5893/c_mara_de_neubauer_melhorada_dupl_quadric_c_pin_as_brand>. Ambos acessados em 04 fev 2011.

A câmara de Neubauer expressa o valor de células por mm^3, para isso soma-se a quantidade de células nos quatro quadrantes destinados para a contagem de leucócitos e multiplica-se o valor por um fator de 50, obtido por meio da fórmula descrita abaixo (Figura 6). É importante ressaltar que a diluição utilizada pode ser alterada para facilitar a contagem das células, entretanto é imprescindível o uso da fórmula para descobrir qual será o novo fator pelo qual será multiplicado o valor da soma dos quatro quadrantes. O número total de células recrutadas à cavidade peritoneal foi utilizado como uma indicação do grau de inflamação.

$$N°\text{de células/mm}^3 = N°\text{ total de células nos 4Q} \times \frac{\text{Diluição}}{N°\text{ de Q} \times \text{Área} \times \text{Altura da câmara}}$$

$$\downarrow$$

$$N°\text{de células/mm}^3 = N°\text{ total de células nos 4Q} \times \frac{20}{4 \times 1\ \text{mm}^2 \times 0{,}1\ \text{mm}}$$

$$\downarrow$$

$$N°\text{de células/mm}^3 = N°\text{ total de células no 4Q} \times 50$$

Figura 6- Cálculo para o número total de leucócitos em câmara de Neubauer. Caso utilize outra diluição, o valor 20 deve ser substituído pelo valor da nova diluição, para que o fator de multiplicação adequado seja encontrado. Q – Quadrantes. Adaptado de: < http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html#02>. Acesso em 16 mar 2011.

3.6. Contagem diferencial das células do líquido peritoneal e sangue total

Uma vez que a contagem diferencial de leucócitos representa um dos parâmetros para avaliação da resposta inflamatória (PORFIRE et al., 2009), utilizou-se o seguinte método para verificar o efeito do tratamento empregado sobre as populações de células inflamatórias. Após a contagem total de células do LP, os tubos de 15 mL foram novamente centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente (405 x g, 4°C por 3 minutos), o sobrenandante foi retirado, deixando-se apenas uma fina camada de líquido acima do precipitado celular. Com auxílio do pipetador automático, as células foram homogeneizadas com essa pequena quantidade de líquido, gerando uma massa celular. Em seguida, esfregaços (Figura 7) foram realizados em lâminas de vidro com ponta fosca, devidamente desengorduradas e identificadas. Para o sangue total, logo após o procedimento de lavagem e coleta na cavidade peritoneal, foram realizadas punções na veia cava de cada animal, a fim de se coletar uma pequena amostra de sangue, que foi imediatamente utilizada para a confecção de esfregaços a exemplo do que foi realizado para as amostras do líquido peritoneal. Para cada animal foram realizados dois esfregaços, os quais foram corados com Panóptico (LB, Laborclin®), de acordo com as recomendações do fabricante.

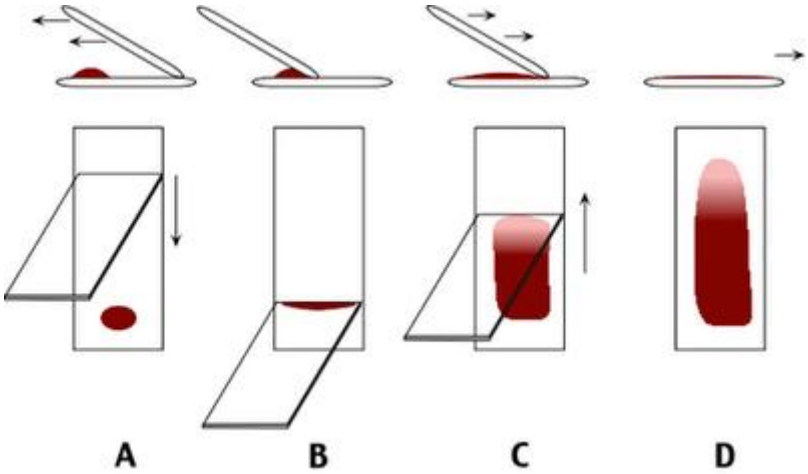

Figura 7- Preparação do esfregaço. **A**. Uma gota da amostra deve ser colocada na extremidade da lâmina, pouco abaixo da parte fosca. **B**. Com a lâmina distensora, toque a gota da amostra e permita que ela se espalhe por capilaridade, se necessário, retire o excesso da lâmina distensora pressionando sua ponta sobre papel macio. **C**. Com um ângulo de inclinação de aproximamente 45° deslize a distensora sobre a lâmina de vidro sem paradas. **D**. O resultado esperado é um esfreçado com cabeça (início), corpo (região central) e cauda (parte final, onde geralmente se realiza a contagem). Disponível em: <http://comediaeciencia.blogspot.com/2008/04/aprenda-fazer-um-esfregao-de-sangue.html>. Acesso em: 05 fev 2011.

Com auxílio de microscopia de luz e objetiva de 100x, um número total de 100 células foi lido em diferentes campos, foram lidas as duas lâminas realizadas para cada animal. A fim de registrar as diferentes populações celulares segundo sua morfologia, utilizou-se um contador manual de células sanguíneas com teclas correspondentes. Dessa forma, foi obtido o percentual de cada tipo celular no sangue e no líquido peritoneal de todos os animais do grupo de estudo. Para cada animal, obteve-se um resultado baseado na média das duas lâminas lidas, sendo o resultado final para cada população expresso como a média dos percentuais obtidos individualmente nos animais componentes do grupo. As principais células observadas foram: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, sendo os últimos desconsiderados para fins estatísticos uma vez que sua ocorrência foi rara (Figura 8).

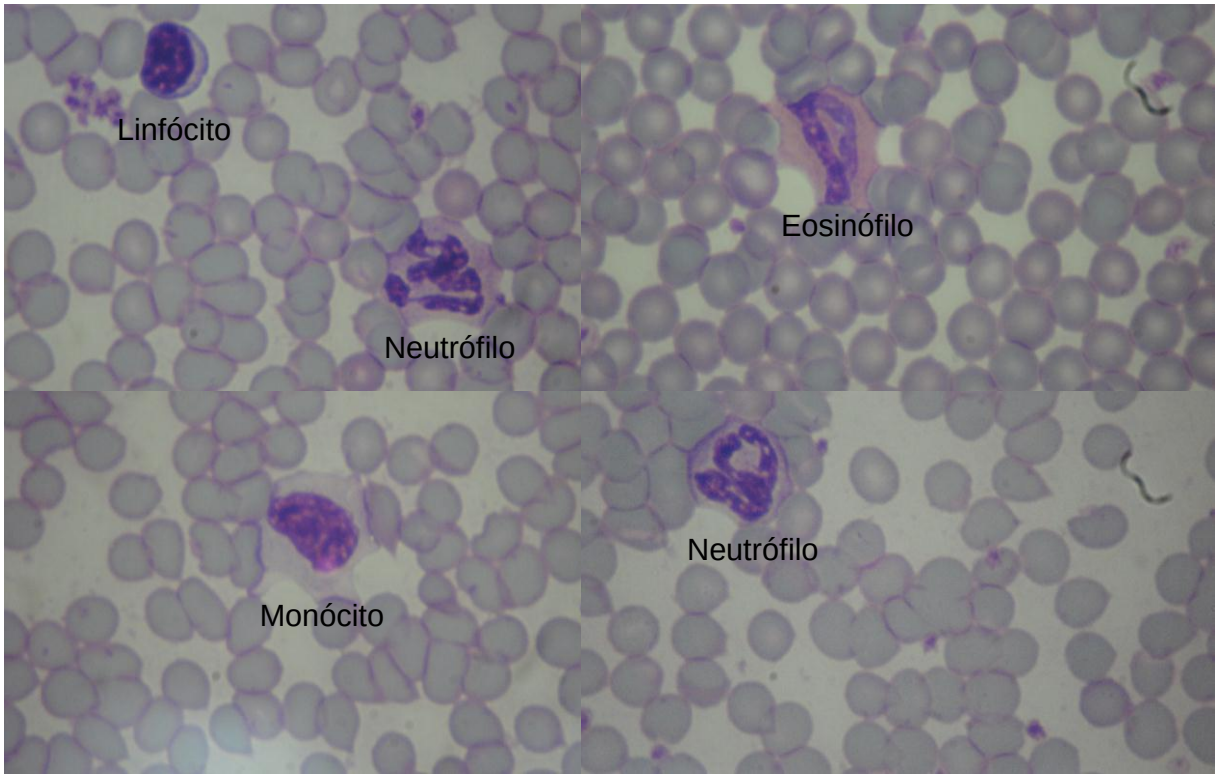

Figura 8- Aspecto morfológico dos principais leucócitos encontrados no sangue periférico de ratos da linhagem Wistar. Aumento de 1000x (objetiva de imersão). Coloração com panótico. Imagens capturadas por câmera digital (Sony DSC-W350) com zoom óptico de 4x.

3.7. Equipamentos

- Microscópio Nikon Eclipse E200;
- Centrífuga Eppendorf 5804 R;
- Contador de células sanguíneas CCS-01 Kacil.

3.8. Análises estatísticas

Os cinco resultados menos dispersos entre si para cada grupo foram escolhidos. Os resultados foram expressos como média ± DP e os grupos, por sua vez, foram comparados utilizando-se a análise de variância (ANOVA). Quando a ANOVA revelou diferença significativa, a comparação múltipla entre os grupos foi realizada pelo pós-teste de Tukey-Kramer, com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando-se o software *GraphPad InStat* (versão 3.05; GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da heparina sobre o influxo de células à cavidade peritoneal

Oito horas após a indução da inflamação, foi evidenciada intensa infiltração celular na cavidade peritoneal, como mostra o controle positivo ($p < 0,001$) (Figura 9). O pré-tratamento dos animais com heparina na dose de 1 µg/Kg de animal ocasionou redução significativa no influxo de células para a cavidade peritoneal, quando comparada com o controle positivo (62,8% de diminuição) ($p < 0,001$). Uma redução maior, mas que não diferiu significativamente da observada para o grupo tratado com diclofenaco (55,1% de redução) ($p < 0,001$) (Figura 9). Já as doses de 5 e 15 µg/Kg de animal não provocaram reduções significativas no influxo de células.

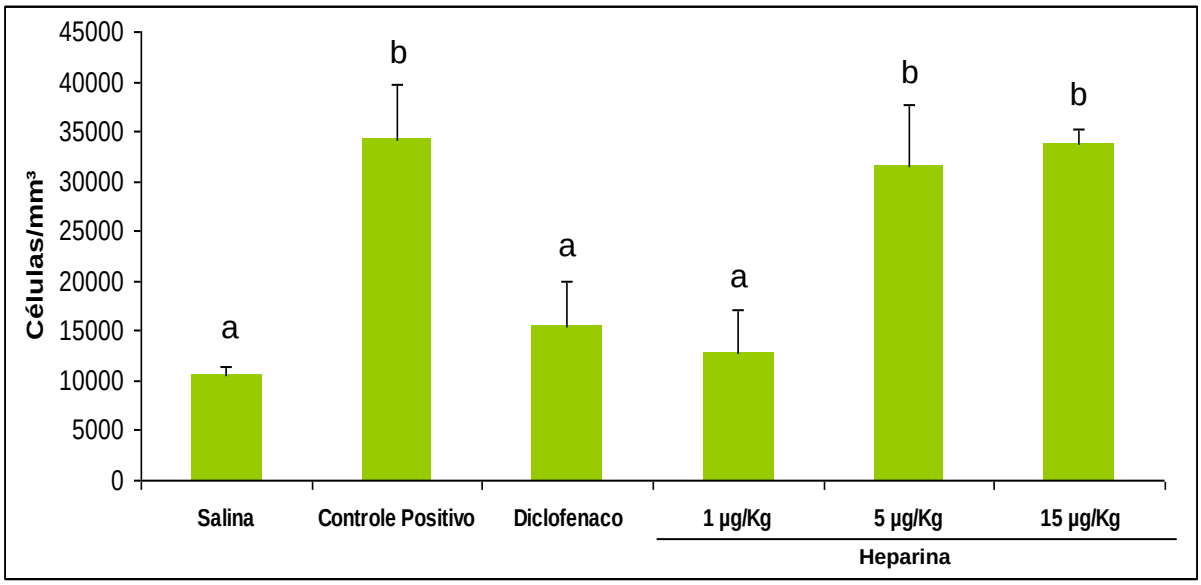

Figura 9- Efeito da heparina sobre o influxo de células para a cavidade peritoneal. Após oito horas, foi evidente o aumento de células na cavidade peritoneal para o grupo controle positivo. Os grupos tratados com diclofenaco e heparina 1 µg/Kg não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo salina. Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do número total de leucócitos peritoneais indicados com letras diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.2. Avaliação das populações celulares no sangue total

4.2.1. Neutrófilos

Houve um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos no sangue total de todos os grupos que receberam estímulo inflamatório em comparação ao grupo salina, aumento médio de 125%. Nos grupos tratados com heparina, as proporções de neutrófilos foram maiores que o controle positivo, sendo as mais altas apresentadas para os grupos tratados com as doses de 1 e 15 µg/Kg, que corresponderam a 49,3 e 60,9% de aumento ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Não houve diferença entre os grupos tratados com heparina e o grupo diclofenaco. Fazendo-se uma comparação apenas entre os grupos tratados com heparina, houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 5 e 15 µg/Kg (Figura 10).

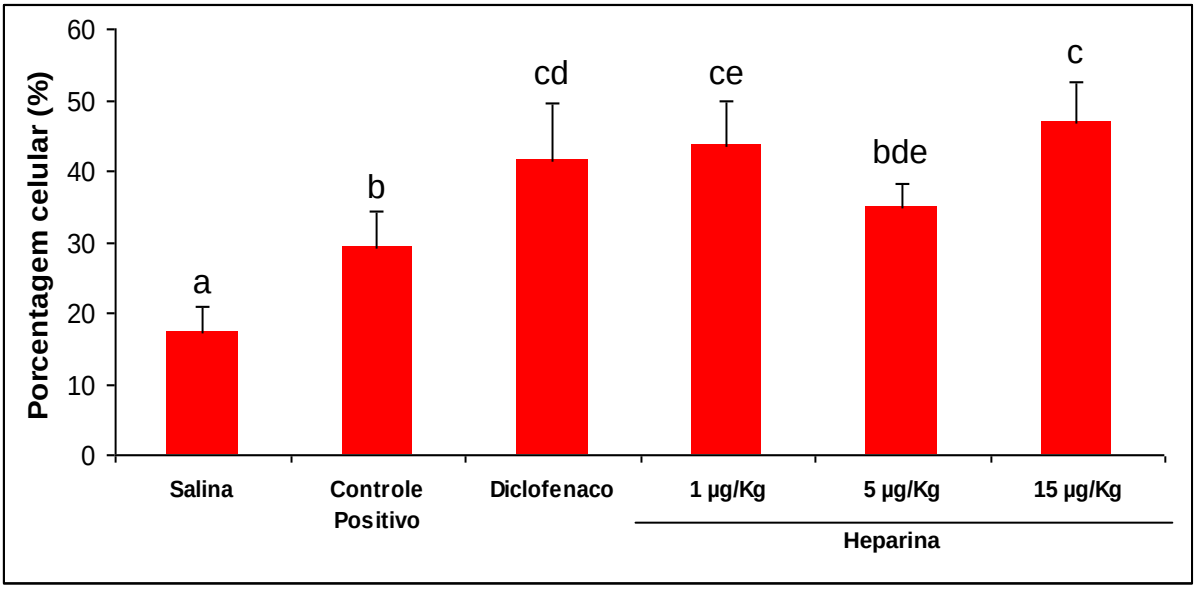

Figura 10- Porcentagens de neutrófilos no sangue total. Os grupos tratados com heparina apresentaram maior percentual de neutrófilos quando comparados ao controle positivo, mas não foram estatisticamente diferentes do grupo tratado com diclofenaco. Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de neutrófilos no sangue que não compartilham letras iguais são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.2.2. Linfócitos

As proporções de linfócitos foram praticamente inversas às proporções de neutrófilos. Para o grupo salina, a proporção de linfócitos (74,8%) foi maior que a de

neutrófilos (17,4%). Ocorreram diminuições significativas na proporção de linfócitos dos grupos tratados com heparina com relação ao grupo salina, sendo a maior delas observada para a dose de 15 µg/Kg de animal, 37,8% ($p < 0,001$) de redução com relação ao controle positivo. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com heparina ou entre estes grupos e o grupo tratado com diclofenaco (Figura 11).

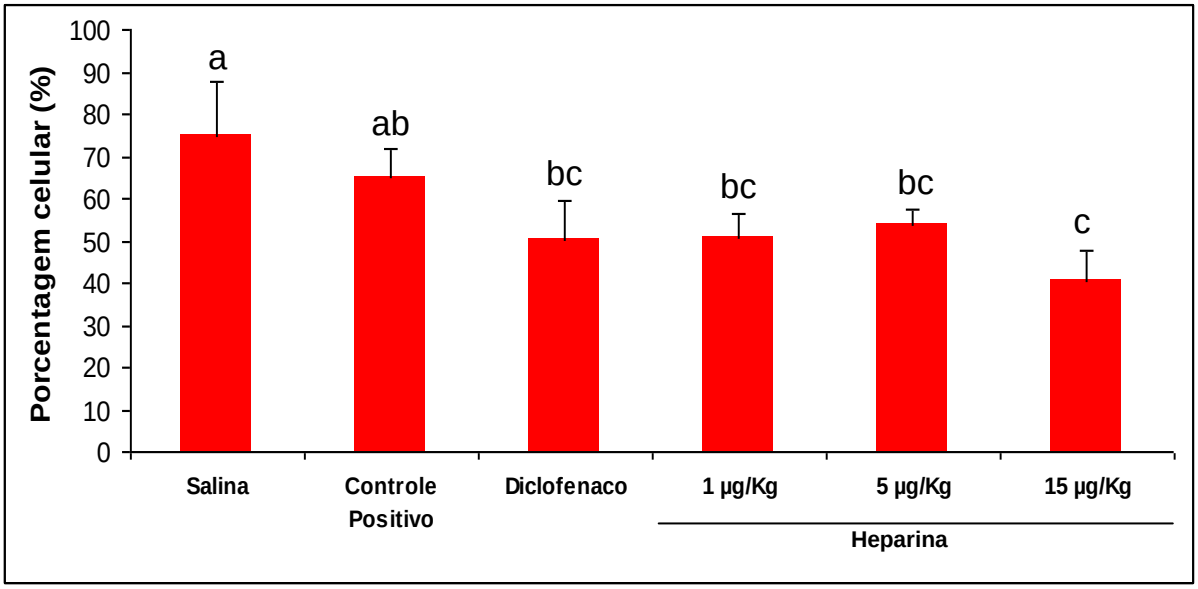

Figura 11- Porcentagens de linfócitos no sangue total. Todos os grupos tratados com heparina apresentaram menor proporção de linfócitos quando comparados ao grupo salina. O grupo tratado com heparina na dosagem de 15 µg/Kg apresentou diminuição significativa com relação ao controle positivo ($p < 0,001$). Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de linfócitos no sangue que não compartilham letras iguais são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.2.3. Monócitos

A proporção de monócitos no sangue total mais elevada foi observada no grupo tratado com heparina na dose de 15 µg/Kg, 117,8% de aumento, quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$). Por outro lado, o grupo tratado com heparina na dosagem de 1 µg/Kg apresentou a mais baixa proporção de monócitos entre todos os grupos de estudo (1,6%), embora não tenha diferido significativamente dos controles, e sim dos grupos diclofenaco e heparina 5 e 15 µg/Kg ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 12).

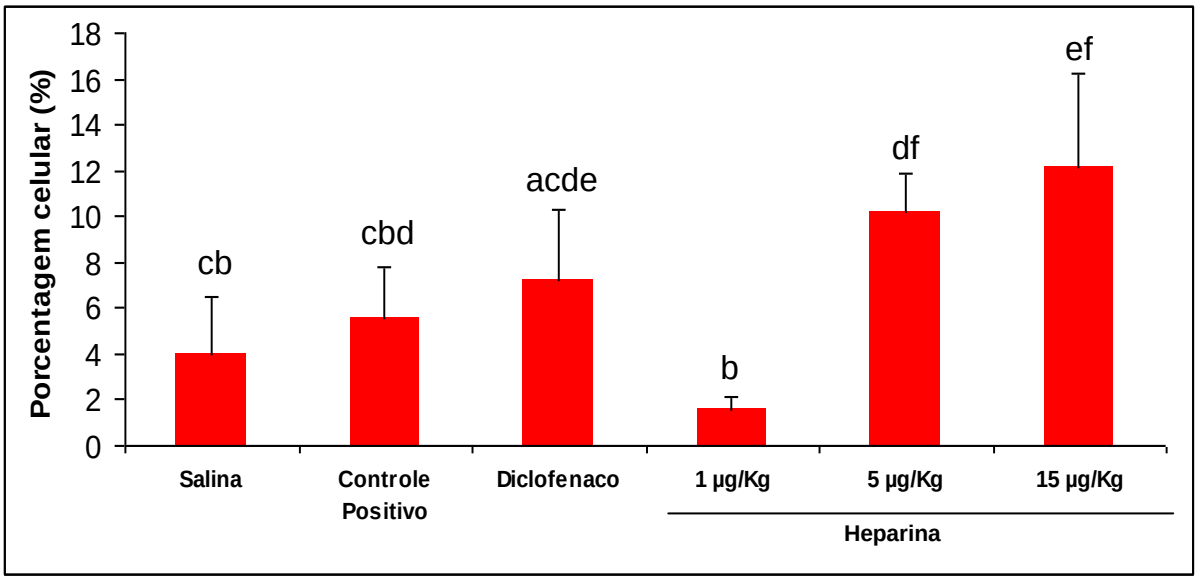

Figura 12- Porcentagens de monócitos no sangue total. A mais alta proporção de monócitos foi observada para o grupo tratado com heparina na dosagem de 15 µg/Kg ($p < 0,01$, com relação ao grupo controle positivo). Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de monócitos no sangue que não compartilham letras iguais são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.3. Avaliação das populações celulares no líquido peritoneal

4.3.1. Neutrófilos

Com relação aos neutrófilos no líquido peritoneal, estes perfaziam 4% do total das células analisadas no grupo salina. Contudo, nos grupos que receberam estímulo inflamatório (ou seja, controle positivo e os grupos tratados com diclofenaco ou heparina), o número percentual de neutrófilos alcançou uma média de 73,2%, o que implica uma situação de inflamação aguda. O grupo que recebeu heparina na dose de 1 µg/Kg, embora tenha apresentado a menor proporção neutrofílica, quando comparada às demais dosagens de heparina, não revelou diminuição significativa na proporção de neutrófilos com relação ao controle positivo. O grupo tratado com heparina na dose de 15 µg/Kg, por sua vez, apresentou uma proporção de neutrófilos mais alta, quando comparada ao grupo controle positivo, 27,3% de aumento ($p < 0,05$). É interessante notar que a referida dosagem apresentou as mais altas porcentagens de neutrófilos tanto no sangue total como no líquido peritoneal, em comparação ao controle positivo e às demais doses de heparina. Os

tratamentos com heparina nas doses de 5 e 15 µg/Kg não apresentaram diferença na proporção neutrofílica em relação ao grupo tratado com diclofenaco (Figura 13).

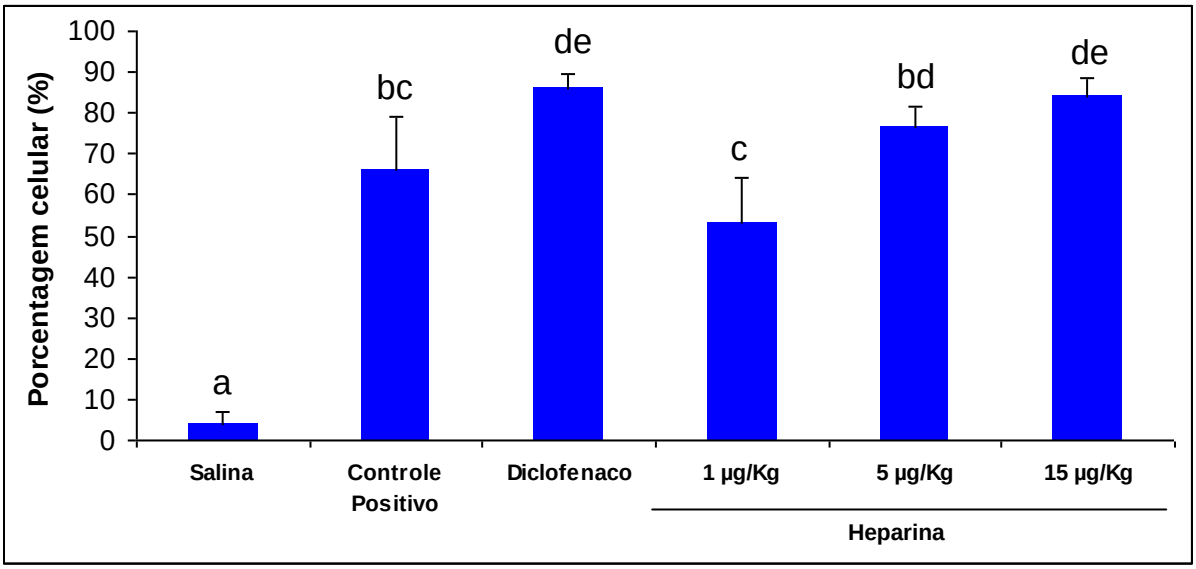

Figura 13- Porcentagens de neutrófilos no líquido peritoneal. O grupo tratado com a mais alta dosagem de heparina utilizada apresentou percentual de neutrófilos maior que o controle positivo ($p < 0,05$). A porcentagem de neutrófilos apresentada pelo grupo tratado com a dosagem de heparina 1 µg/kg foi significativamente menor que aquelas apresentadas pelos demais grupos tratados com heparina e o grupo tratado com diclofenaco ($p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de neutrófilos no líquido peritoneal que não compartilham letras iguais são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.3.2. Linfócitos

A porcentagem de linfócitos não foi afetada pelo estímulo inflamatório, como mostra a ausência de alteração significativa entre o grupo salina e o controle positivo. O grupo tratado com heparina na dose de 1 µg/Kg apresentou a mais alta proporção de linfócitos, 30,4%, ($p < 0,05$ com relação ao grupo salina) entre todos os grupos de estudo, contudo foi o que mostrou maior semelhança com grupo que não recebeu estímulo inflamatório. Nos grupos que receberam tratamento com diclofenaco ou heparina na doses de 5 e 15 µg/Kg, a porcentagem de linfócitos foi significativamente mais baixa quando comparada com o grupo controle positivo ($p < 0,001$), diminuição média de 71,50% (Figura 14).

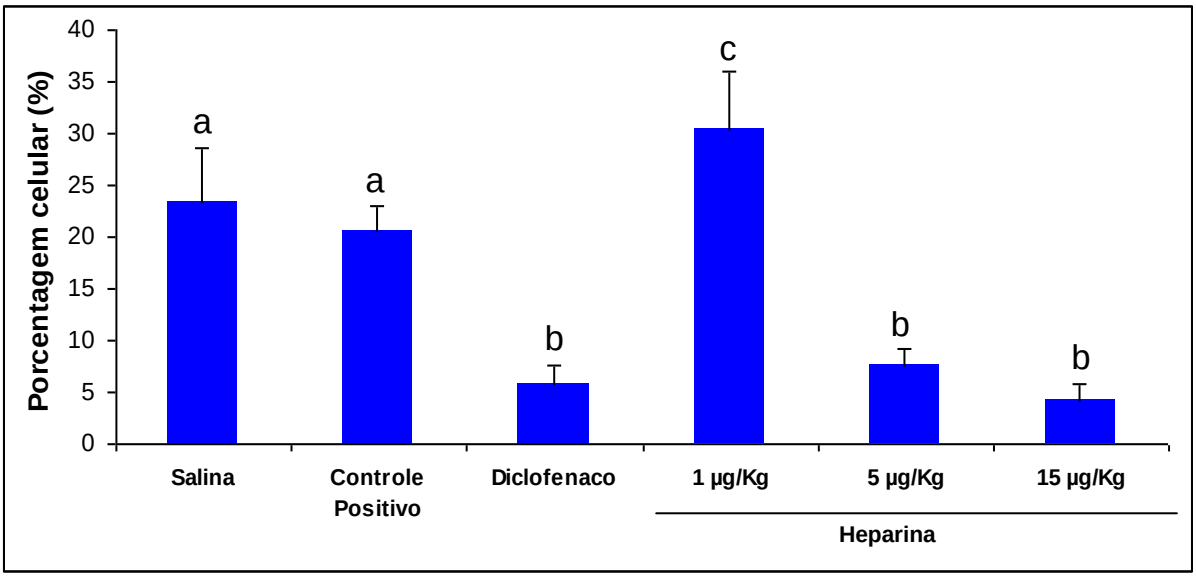

Figura 14- Porcentagens de linfócitos no líquido peritoneal. O grupo tratado com heparina na dosagem de 1 µg/kg foi o que mais se assemelhou ao grupo salina. Os grupos tratados com diclofenaco ou heparina nas doses de 5 e 15 µg/kg apresentaram porcentagens de linfócitos mais baixas com relação ao controle positivo ($p < 0,001$). Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de linfócitos no líquido peritoneal indicados com letras diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.3.3. Macrófagos

Observamos uma clara diminuição da proporção de macrófagos no líquido peritoneal, quando comparamos o grupo salina aos grupos que receberam estímulo inflamatório. Sendo que a proporção dessas células passou de 27,4% do total de células no líquido peritoneal para uma média de 4,72%, considerando todos os grupos que receberam estímulo com tioglicolato de sódio. Não houve diferenças estatísticas entre o controle positivo e os grupos que receberam tratamento com diclofenaco ou as diferentes doses de heparina (Figura 15).

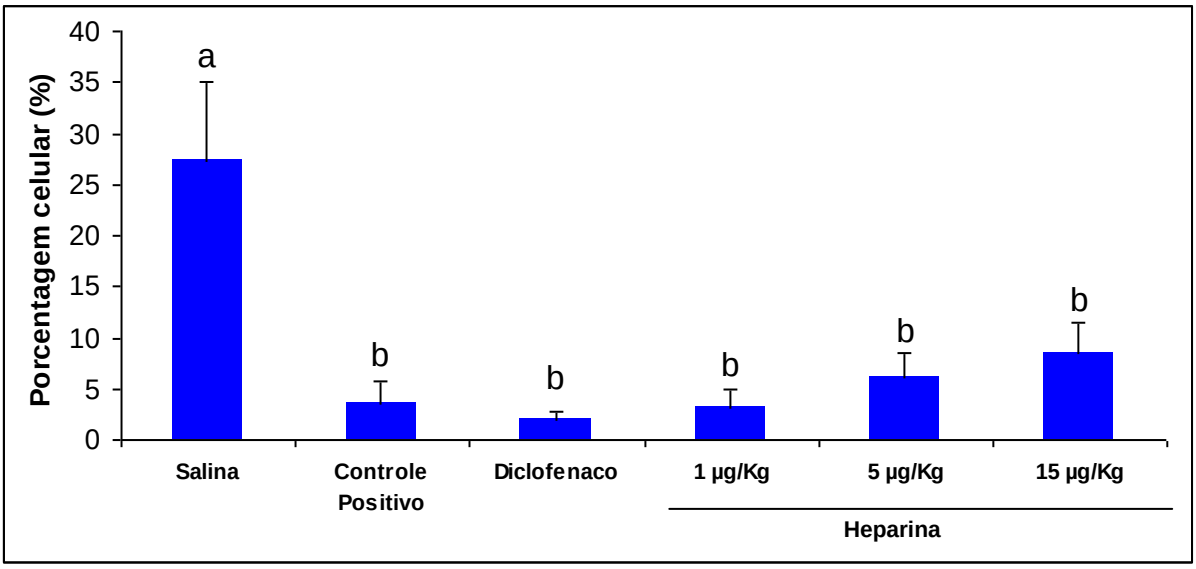

Figura 15- Porcentagens de macrófagos no líquido peritoneal. Pode-se observar que, nos animais que receberam estímulo inflamatório, o percentual de macrófagos foi muito menor em relação aos animais do grupo salina. Não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos que receberam estímulo inflamatório com tioglicolato. Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de macrófagos no líquido peritoneal indicados com letras diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

4.3.4. Eosinófilos

Para os eosinófilos presentes no líquido peritoneal, é interessante notar o número percentual dessas células no grupo salina, 53,2%. Os outros grupos de estudo mostraram uma diminuição média de 88,12% na proporção de eosinófilos. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com heparina ou diclofenaco para o percentual de eosinófilos no líquido peritoneal, entretanto vale salientar que o grupo tratado com heparina na dose de 1 µg/kg apresentou a menor proporção de eosinófilos entre os grupos que receberam estímulo inflamatório, 1,8% (Figura 16).

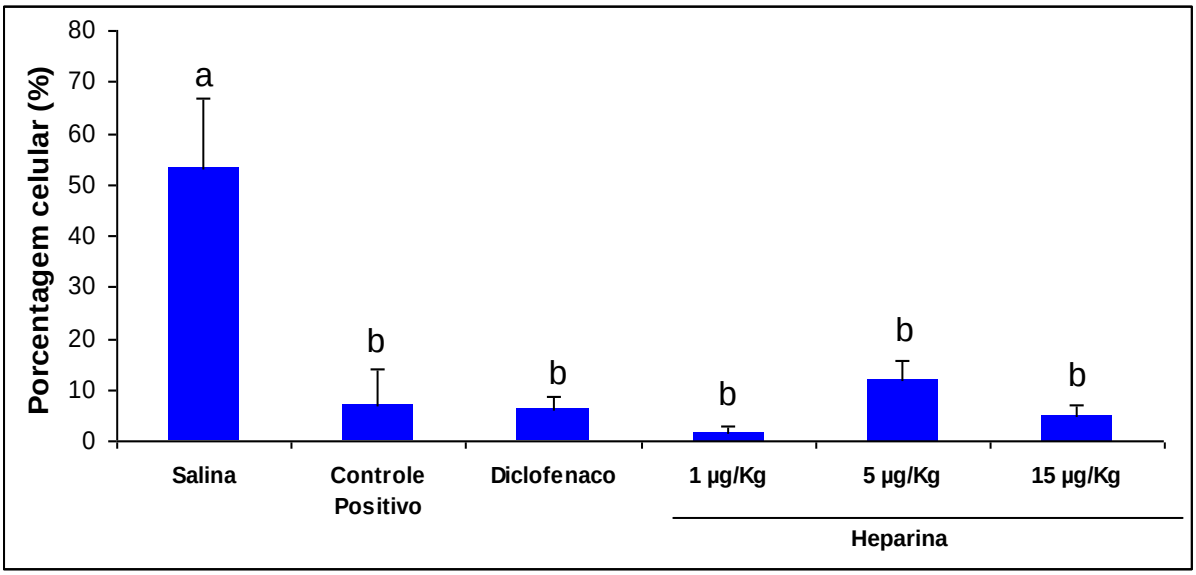

Figura 16- Porcentagens de eosinófilos no líquido peritoneal. Do mesmo modo observado para os macrófagos, as proporções de eosinófilos foram menores em todos os grupos que receberam estímulo inflamatório e não apresentaram diferença estatística entre si. Cada coluna representa os valores médios ± DP em grupos de cinco animais. Os valores médios do percentual de eosinófilos no líquido peritoneal indicados com letras diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA ($p < 0,0001$). Dosagem utilizada para o diclofenaco de sódio (Voltaren®), 4,6 mg/Kg.

5. DISCUSSÃO

O recrutamento de leucócitos é um evento imprescindível para uma resposta adequada do organismo à invasão por patógenos ou danos teciduais, uma vez que a participação dessas células, além de ser importante para a remoção do agente agressor, também tem papel fundamental nos mecanismos de reparo tecidual (WANG et al., 2002). Em condições de inflamação aguda, destacam-se os neutrófilos, primeiras células a chegarem ao sítio de inflamação (BALESTIERI, 2006). Entretanto, o excessivo recrutamento e ativação dessas células podem contribuir para a fisiopatologia de várias doenças inflamatórias, tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica, doença de Behçet, artrite reumatóide, entre outras (WRIGHT et al., 2010; O'DELL, 2004). Sendo assim, estratégias terapêuticas que atenuem a inflamação aguda, sem comprometer os mecanismos essenciais de defesa, são benéficas para a prevenção de danos mediados por neutrófilos. Em estudo prévio realizado em nosso laboratório, utilizando um modelo de peritonite aguda induzida por tioglicolato, demonstramos a capacidade da heparina de reduzir, em até mais de 80%, a infiltração leucocitária à cavidade peritoneal após 3 horas de indução da inflamação (BRITO et al., 2008). Uma vez que a infiltração neutrofílica é máxima por volta de 8 horas (HARTT et al., 1999; LAGASSE; WEISSMAN, 1996), o mesmo modelo foi realizado neste trabalho, mas permitindo um tempo maior de resposta inflamatória.

A peritonite induzida por tioglicolato causou expressiva infiltração leucocitária. A contagem total de leucócitos foi significativamente aumentada no líquido peritoneal dos ratos sujeitos à injeção i.p. de tioglicolato (34302 ± 5304,3 céls/mm^3), quando comparado com o grupo controle (10609 ± 852,76 céls/mm^3) ($p < 0,001$), resultado semelhante ao obtido em um modelo de peritonite fecal cujas amostras do líquido também foram coletadas após 8 horas de indução da inflamação (KHAN, 2005).

Se compararmos os resultados obtidos no presente trabalho com os experimentos prévios realizados com 3 horas de inflamação (BRITO et al., 2008), observamos que a dosagem de heparina de 1 µg/Kg foi a única capaz de manter efeito antimigratório. Por outro lado, as dosagens de 5 e 15 µg/Kg que foram responsáveis, respectivamente, por diminuições de 81,54 e 47,9% da infiltração leucocitária após 3 horas de indução da peritonite (BRITO et al., 2008), não foram

capazes de manter seu efeito antimigratório, 8 horas após a indução da inflamação. Estes resultados sugerem que o efeito da heparina sobre o recrutamento de leucócitos à cavidade peritoneal depende do tempo e da dose utilizados.

Segundo Harlan & Winn (2002), aparentemente, os mecanismos responsáveis pela infiltração neutrofílica com um curto período de inflamação são diferentes daqueles associados a um período mais longo de lesão. Bullard et al. (1995), em modelo de peritonite induzida por inoculação i.p. de *Streptococcus pneumonie*, relataram a ausência de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal 4 horas após a indução da inflamação, em camundongos mutantes deficientes em P-selectina e ICAM-1 (P^-/I^-). Posteriormente, um modelo de peritonite induzida por ligadura-transfixação cecal realizado por Crockett et al. (2004), também com animais P^-/I^-, mostrou que a mutação não inibiu a infiltração neutrofílica ao peritônio, após 6 e 24 horas da indução da inflamação. Esses diferentes resultados podem ser reflexo das diferenças de duração entre os experimentos, o que sugere a possível existência de um papel funcional para P-selectina e ICAM-1 somente durante os estágios iniciais da resposta inflamatória e, enquanto o processo inflamatório progride, esses mecanismos deficientes de adesão são contornados graças à redundância funcional de outras moléculas de adesão e produção de citocinas (CROCKETT et al., 2004).

Portanto, com base nesses estudos, uma possível explicação para a diferença entre os resultados obtidos nos experimentos realizados nos tempos de 3 e 8 horas, para as dosagens de 5 e 15 µg/Kg, poderia estar na capacidade da heparina de se ligar à P-selectina e à integrina Mac-1, impedindo a interação das mesmas com suas moléculas ligantes, o que levaria a um comprometimento das interações iniciais entre leucócitos e endotélio. No caso da Mac-1, seu ligante é a ICAM-1, molécula cuja expressão endotelial já mostrou ser inibida pela heparina (MILLER et al., 1998). Essa possibilidade é reforçada pelo papel inibitório da heparina durante o rolamento celular em endotélio inflamado, que ocorre às 2, mas não é mantido 5 horas após estímulo com TNF-α (PERRETTI; PAGE, 2000). Além disso, um estudo utilizando heparina não fracionada administrada intraperitonealmente também mostrou tempo-dependência na inibição do recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, após 2 horas de inflamação a heparina apresentou efeito antimigratório, o qual não foi mantido após 4 horas de inflamação (LEVER et al., 2010).

Outra hipótese para a diferença observada entre os experimentos de 3 e 8 horas pode estar relacionada a aspectos farmacocinéticos da heparina. A heparina não fracionada é heterogênea quanto ao peso molecular, apresentando moléculas cuja massa varia de 2000 a 40.000 Da (NADER et al., 2004; JOHNSON; MULLOY, 1976); sua retirada da circulação é influenciada pelo tamanho, com as espécies de maior massa molecular sendo removidas da circulação mais rapidamente do que aquelas de massa molecular mais baixa; esse fenômeno resulta em um acúmulo *in vivo* de moléculas de menor tamanho, as quais, embora detenham muitas das atividades das espécies maiores, são menos efetivas com relação aos efeitos relacionados à adesão de neutrófilos ao endotélio (LEVER et al., 2007; HIRSH et al., 1995).

Os dados de farmacocinética da heparina associados aos estudos mencionados sobre os mecanismos envolvidos na infiltração neutrofílica em diferentes tempos de inflamação, fundamentam bem o fato da heparina, nas doses de 5 e 15 µg/Kg, apresentar efeitos distintos após 3 e 8 horas de indução da inflamação. Além disso, de acordo com Hirsh et al. (1995), a cinética da heparina gera uma resposta anticoagulante à doses terapêuticas de forma não linear, cuja intensidade e duração variam de acordo com o aumento da dosagem. Portanto, considerando que a farmacocinética da heparina também interfere nas suas propriedades anti-inflamatórias, é possível sugerir que o uso deste fármaco nas doses de 5 e 15 µg/Kg, por um período maior de tempo, tenha tido efeito sobre outras proteínas, além daquelas envolvidas na resposta inflamatória que ocorre durante um período de 3 horas.

A ação da heparina no modelo estudado foi comparada com a eficácia do diclofenaco de sódio (Voltaren®), um anti-inflamatório da classe dos AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) (FILHO et al., 2006) presente na lista de fármacos de referência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para calcular a dosagem de diclofenaco a ser administrada, utilizou-se o método de extrapolação alométrica (PACHALY; BRITO, 2000). Nesse caso, foi feita a adaptação da dosagem terapêutica normalmente utilizada em humanos para ratos da linhagem Wistar, chegando-se ao valor de 4,6 mg/Kg. Observou-se que a heparina na dose de 1 µg/Kg mostrou-se tão eficiente quanto o diclofenaco de sódio na redução do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal, 8 horas após a indução da inflamação (Figura 9). Vale salientar que esse efeito foi obtido utilizando-se uma dose de

heparina cerca de quatro mil vezes menor que a dosagem terapêutica empregada para o diclofenaco. Embora os anti-inflamatórios não esteroidais sejam largamente utilizados tanto por seres humanos, quanto por animais (FILHO et al., 2006; ANDRADE et al., 2002) esses fármacos apresentam efeitos colaterais importantes tais como lesões gastrointestinais agudas - o risco de perfuração e ulceração gástrica apresenta incidência 3 a 4 vezes maior em usuários destes compostos (BUTTGEREIT et al., 2001) - , além de toxicidade renal e hepática (BRICKS; SILVA, 2005; SALLUSTIO; HOLBROOK, 2001; VANE; BOTTING , 1998); o que justifica a busca por fármacos que apresentem atividade anti-inflamatória satisfatória, mas sem induzir tais prejuízos, papel para o qual a heparina vem se mostrando promissora (YOUNG, 2008).

Na contagem diferencial do sangue periférico para o grupo salina, a proporção de linfócitos foi maior que a de neutrófilos, o contrário do que ocorre para humanos. Esse resultado é condizente com outros experimentos realizados com ratos da linhagem Wistar e camundongos, tanto para as populações já mencionadas, quanto para as demais populações, monócitos, eosinófilos e basófilos (LEANDRO et al., 2006; KREIMER et al., 2005; CROCKETT et al., 2004; LAGASSE; WEISSMAN, 1996). Todos os grupos que receberam estímulo inflamatório com tioglicolato apresentaram uma proporção de neutrófilos mais alta no sangue total, quando comparados ao grupo salina, o que se correlaciona com o estado inflamatório do rato (LAGASSE; WEISSMAN, 1996). As populações celulares no líquido peritoneal do grupo controle negativo foram distribuídas, em ordem decrescente, da seguinte forma: eosinófilos, monócitos, linfócitos e neutrófilos (não foram observados basófilos). Nos grupos que receberam injeção i.p. de tioglicolato, a média dos grupos revelou que mais de 70% das células na cavidade peritoneal era composta por neutrófilos. Esse resultado corresponde ao esperado, uma vez que neutrófilos migram para o sítio de inflamação em torno de 4 a 12 horas após o estímulo, sendo o pico máximo de recrutamento alcançado às 8 horas e essas células são as principais envolvidas em uma resposta inflamatória peritoneal (BALESTIERI, 2006; CROCKETT et al., 2004; HARTT et al., 1999; LAGASSE; WEISSMAN, 1996;). O grupo tratado com a dose de heparina de 1 µg/Kg apresentou a segunda maior proporção de neutrófilos no sangue total, mas interessantemente teve a mais baixa proporção dessas células no líquido peritoneal, quando comparado ao grupo controle positivo e às outras dosagens de heparina,

isso se relaciona com o fato de que essa foi a única dosagem capaz de manter o efeito antimigratório da heparina 8 horas após o estímulo inflamatório; a proporção neutrofílica alta no sangue total e baixa no líquido peritoneal, sugere que provavelmente a diapedese dessas células foi prejudicada pela ação da heparina sobre as moléculas de adesão, como discutido anteriormente. O grupo tratado com heparina na dose de 5 µg/Kg apresentou proporção de neutrófilos e monócitos mais altas que o grupo controle positivo, tanto no sangue total como no líquido peritoneal, entretanto esses aumentos não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, para a dosagem de 15 µg/Kg, a proporção de neutrófilos no sangue total e no líquido peritoneal foi significativamente mais alta quando comparada ao controle positivo, assim como a proporção de monócitos no sangue total, o que caracteriza um efeito pró-inflamatório. O grupo tratado com diclofenaco apresentou proporções celulares mais semelhantes às dosagens de heparina de 5 e 15 µg/Kg, mostrando que as principais alterações nas proporções celulares, em especial a proporção neutrofílica no líquido peritoneal, aconteceram realmente no grupo tratado com heparina na dosagem de 1 µg/Kg.

Alguns pesquisadores demonstraram que, em ensaios com sangue total, a ação pró-inflamatória tanto da heparina quanto da heparina de baixo peso molecular está relacionada com a habilidade de tais moléculas em aumentar a liberação de citocinas como TNF-α, IL-1β e IL-8 por monócitos ativados por LPS, LTA ou PGN (HOCHART et al., 2008; HEINZELMANN; BOSSHART, 2005; HEINZELMANN, 1999). Além disso, a heparina é removida da circulação através de um mecanismo de depuração (*clearance*) que tem início com uma fase de saturação rápida, a qual acredita-se que ocorre devido a ligação da heparina a receptores presentes em células endoteliais (GLIMELIUS et al., 1978; MAHADOO et al., 1977) e macrófagos (FRIEDMAN; ARSENIS, 1974). Baseando-se nesses estudos, a heparina nas dosagens de 5 e 15 µg/Kg pode ter estimulado a liberação de citocinas pró-inflamatórias devido a sua propriedade de se ligar às células mencionadas, o que justificaria o aumento na proporção de neutrófilos e monócitos observadas no sangue total e líquido peritoneal e o fato dessas dosagens não terem preservado o efeito antimigratório observado para a heparina no experimento de peritonite com 3 horas.

Um dado que chamou atenção foi o elevado número de eosinófilos presentes no grupo controle negativo (53,2%). Os eosinófilos são leucócitos multifuncionais

relacionados com a patogênese de numerosos processos inflamatórios, incluindo infecções parasitárias por helmintos e doenças alérgicas (ROTHENBERG, 1998; WELLER, 1994; GLEICH; LOEGERING, 1984). Nos animais estudados, a possibilidade de infecção parasitária não persiste, uma vez que não foi observada eosinofilia no sangue total (dados não mostrados). Estudos *in vitro* mostram que sob condições de hipóxia ocorre um aumento na sobrevida de eosinófilos (GARDAI et al., 2003). Na cavidade peritoneal ocorre baixa pressão de oxigênio, o que pode contribuir para uma sobrevivência aumentada dessas células nesse sítio (SAWYER et al., 1991); além disso, a migração de eosinófilos para o peritônio em condições homeostáticas se mostrou ser um processo ativo (OHNMACHT, 2007). Tomadas juntas, essas informações apontam o peritônio como um reservatório de eosinófilos, de onde eles podem recircular para outros tecidos (OHNMACHT, 2007), o que pode explicar a maior proporção dessas células no peritônio nos animais pertencentes ao grupo salina.

Diversos estudos relatam a capacidade da heparina como inibidor da inflamação, contudo a literatura também mostra que esse efeito anti-inflamatório depende de fatores como a dose ou o modelo de estudo, podendo a heparina apresentar, em alguns casos, efeitos pró-inflamatórios. No presente trabalho, demonstramos que esse clássico fármaco apresenta efeitos diferentes, de acordo com o tempo de inflamação e a dosagem utilizada em um modelo de peritonite aguda induzida por tioglicolato. Visto que a heparina já é utilizada intermitentemente durante episódios de peritonite em pacientes que realizam diálise peritoneal (MARGETTS, 2009) e que poucos trabalhos dão enfoque ao perfil leucocitário observado durante o tratamento com heparina, pretendemos, com esse estudo, contribuir para melhor elucidação do papel da heparina durante a inflamação, em especial a peritonite.

6. CONCLUSÕES

- Após 8 horas de inflamação, apenas a dose de heparina de 1 µg/Kg foi capaz de manter a capacidade de interferir na migração leucocitária, a exemplo do efeito observado com 3 horas de inflamação;

- Baseando-se nos aumentos da proporção de neutrófilos e monócitos no sangue total e líquido peritoneal a heparina na dosagem de 15 µg/Kg apresentou efeito pró-inflamatório;

- No modelo de peritonite estudado a heparina apresentou efeito antimigratório dependendo do tempo de inflamação e da dose administrada;

- No modelo experimental utilizado, a heparina apresentou efeito anti e pró-inflamatório, corroborando dados da literatura que lhe atribuem um papel como imunomodulador pleiotrópico.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Lista de medicamentos de referência**, 2011. 25 p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0fed7180402d4a9985e38754e035b7cb/lista_a_160511.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 18 maio. 2011.

ANDRADE, S. F.; JERICÓ, M. M. Antiinflamatórios. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2: 89-113, 2002.

BALESTIERI, Filomena M.P. *Imunologia*. 1. ed. São Paulo: Manole, 2006.

BELMIRO, C. L. R.; CASTELO-BRANCO, M. T. L.; MELIM, L. M. C.; SCHANAIDER, A.; ELIA, C.; MADI, K.; PAVÃO, M. S. G.; SOUZA, H. S. P. Unfractionated Heparin and New Heparin Analogues from Ascidians (Chordate-Tunicate) Ameliorate Colitis in Rats. **J Biol Chem**. 284: 11267–11278, 2009.

BISIO, A.; DE AMBROSI, L.; GONELLA, S.; GUERRINI, M.; GUGLIERI, S.; MAGGIA, G.; TORRI, G. Preserving the original heparin structure of a novel low molecular weight heparin by gamma-irradiation**. Arzneimittelforschung**. 51:806-13, 2001.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos antiinflamatórios não-hormonais. **Pediatria**. 27:181-193, 2005.

BRITO, A.S.; ARIMATEIA, D.S; SOUZA, L.R.; LIMA, M.A.; FERREIRA, P.A.; SILVA, R.A.; VERISSIMA, C.F.; JUSTO, G.Z.; LEITE, E.L.;ANDRADE, G.P.V.; OLIVEIRA, F.W.; NADER, H.B. & CHAVANTE, S.F. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycoaminoglycan with reduced anticoagulante activity isolated from a marine invertebrate. **Bioorg Med Chem**. 16: 9588-95951, 2008.

BROWN, R. A.; LEVER, R.; JONES, N. A.; PAGE, C.P. Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release *in vitro*. **Br J Pharmacol**. 139: 845–853, 2003.

BULLARD, D.C.; QIN, L.; LORENZO, I.; QUINLIN, W.M.; DOYLE, N.A.; BOSSE, R.; VESTWEBER, D.; DOERSCHUK, C.M.; BEAUDET, A.L. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. **J Clin Invest**. 95:1782-1788, 1995.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTER, G.R.; SIMON, L.S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal antiiflammatory drugs and cyclooxygenase-2 specific inhibitors. **Am J Med**.110: 13-19, 2001.

CONRAD, H. E. Heparin-Binding Proteins. **Academic Press**, San Diego. 1998.

CRAIG, R.; LARKIN, A.; MINGO, M.; THUERAUF, D.J.; ANDREWS, C.; MCDONOUGH, P.M. et al. P38 MAPK and NF-κB collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. **J Biol Chem**. 31:23814–24, 2000.

CROCKETT, E. T.; REMELIUS, C.; HESS, K.; AL-GHAWI, H. Gene deletion of P-Selectin and ICAM-1 does not inhibit neutrophil infiltration into peritoneal cavity following cecal ligation-puncture. **BMC Clin Pathol**. 26:4:2 doi:10.1186/1472-6890-4-2, 2004.

DELCAUX, C.; DELACOURT, C.; d'ORTHO, M.P.; BOYER, V.; LAFUNA, C.; HARF, A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 14:288, 1996.

DZIARSKI, R.; TAPPING, R. I.; TOBIAS, P. S. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. **J Biol Chem**. 273:8680, 1998.

ENGSTAD, C.S.; GUTTEBERG, T.J.; OSTERUD, B. Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. **Thromb Haemost**. 77:690-696, 1997.

FILHO, R.; GARCIA, J.; KORUKIAN, M.; SANTOS, F. P. E.; VIOLA, D. C. M.; PUERTAS, E. B. Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, comparativo entre a associação de cafeína, carisoprodol, diclofenaco sódico e paracetamol e a ciclobenzaprina, para avaliação da eficácia e segurança no tratamento de pacientes com lombalgia e lombociatalgia agudas. **Acta Ortop Bras**. 14: 11–16, 2006.

FREEDMAN, M.D. Pharmacodynamics, clinical indications, and adverse effects of heparin. **J Clin Pharmacol**. 32:584-596, 1992.

FRENETTE, P. S.; MAYADAS, T. N.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O.; WAGNER, D. D. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. **Cell**. 84: 563–574, 1996.

FRIEDMAN, Y.; ARSENIS, C. Studies on the heparin sulphamidase activity from rat spleen: intracellular distribution and characterization of the enzyme. **Biochem J**. 139:699-708, 1974.

GARDAI, S. J.; HOONTRAKOON, R.; GODDARD, C. D.; DAY, B. J.; CHANG, L. Y.; HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Oxidant-mediated mitochondrial injury in eosinophil apoptosis: enhancement by glucocorticoids and inhibition by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J Immunol**. 170: 556–566, 2003.

GLEICH, G.J.; LOEGERING, D.A. Immunobiology of eosinophils. **Annu Rev Immunol**. 2:429–59, 1984.

GLIMELIUS, B.; BUSCH, C.; HOOK, M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. **Thromb Res**. 12:773-82, 1978.

GUNAY, N. S.; LINHARDT, R. J. Heparinoids: Structure biological activities and therapeutic applications. **Planta Med**. 65: 301–306, 1999.

GWECHENBERGER, M.; MENDOZA, L.H.; YOUKER, K.A.; FRANGOGIANNIS, N.G.; SMITH, W.; MICHEAL, L.H. et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarcts. **Circulation**. 99:546–51, 1999.

HARLAN, J.H; WINN, R.K. Leukocyte-endothelial interactions: Clinical trials of anti-adhesion therapy. **Crit Care Med**. 5:S214-S219, 2002.

HARTT, J. K.; BARISH, G.; MURPHY, P.M.; GAO, J.L. N-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. Molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil. **FPR J Exp Med**. 190:741–747, 1999.

HAYWARD, R.; NOSSULI, T.O.; LEFER, A.M. Heparinase III exerts endothelial and cardioprotective effects in feline myocardial ischemiareperfusion injury. *J.* **Pharmacol Exp Ther***.* 283:1032–1038, 1997.

HEINZELMANN, M.; BOSSHART, H. Heparin binds to lipopolysaccharide (LPS)-binding protein, facilitates the transfer of LPS to CD14, and enhances LPS-induced activation of peripheral blood monocytes. **J Immunol**. 174: 2280–228, 2005.

HEINZELMANN, M.; MILLER, M.; PLATZ, A.; GORDON, L. E.; HERZIG, D.O.; POLK Jr, H.C. Heparin and Enoxaparin Enhance Endotoxin-Induced Tumor Necrosis Factor-a Production in Human Monocytes. **Ann Surg**. 229: 542-550, 1999.

HERMANN, C.; SPREITZER, I.; SCHRODER, N. W.; MORATH, S.; LEHNER, M. D.; FISCHER, W.; SCHUTT, C.; SCHUMANN, R. R.; HARTUNG, T. Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species: role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-γ release. **Eur J Immunol**. 32:541. 2002.

HIRSH, J.; WARKENTIN, T. E.; SHAUGHNESSY, S.G.; ANAND, S. S.; HALPERIN, J.L.; RASCHKE, R.; GRANGER, C.; OHMAN, E.M.; DALEN, J.E. Heparin and low-molecular- weight heparin mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. **Chest**. 119:64S–94S, 2001.

HIRSH, J; RASCHKE, R; WARKENTIN, T.E.; DALEN, J.E.; DEYKIN, D.; POLLER, L. Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. **Chest**. 108: 258s-275s, 1995.

HOCHART, H.; JENKINS, P. V.; PRESTON, R. J. S.; SMITH, O. P.; WHITE, B.; O'DONNELL, J. Concentration-dependent roles for heparin in modifying lipopolysaccharide-induced activation of mononuclear cells in whole blood. **Thromb Haemost**. 99: 570–575, 2008.

JOHNSON, E.A.; MULLOY B. The molecular weight range of commercial heparin preparations. **Carbohydr Res**. 51:119-27,1976.

JOHNSTON, B.; BUTCHER, E.C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. **Semin Immunol**. 14:83, 2002.

JONES, H.; PAUL, W.; PAGE, C. P. The effects of heparin and related molecules on vascular permeability and neutrophil accumulation in rabbit skin. **Br J Pharmacol**.135: 469 ± 479, 2002.

JORDON, R.E.; OOSTA, G.M.; GARDNER, W.T.; ROSENBERG, R.D. The binding of low molecular weight heparin to hemostatic enzymes. **J Biol Chem** 255: 10081-10080, 1980.

KHAN, H. A. Effect of Fluconazole on Phagocytic Response of Polymorphonuclear Leukocytes in a Rat Model of Acute Sepsis. **Mediators Inflamm**. 1: 9-15, 2005.

KOENIG, A.; NORGARD-SUMNICHT, K.; LINHARDT, R.; VARKI, A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. **J Clin Invest**. 101:877–889, 1998.

KREIMER, F.; AGUIAR, J. L. A.; CASTRO, C. M. M. B.; LACERDA, C. M.; REIS, T.; JÚNIOR, F. L. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. **Acta Cir Bras**. 20: 31-39, 2005.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I.L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J Immunol Methods**. 197:139–150, 1996.

LEANDRO, C. G.; NASCIMENTO, E.; AZEVEDO, M. M.; VIEGAS, A.; ALBUQUERQUE, C.; CAVALCANTI, C. B.; MANHÃES-DE-CASTRO, R; CASTRO, C. M. M. B. Efeito da L-Glutamina sobre o perfil leucocitário e a função fagocítica de macrófagos de ratos estressados. **Rev Nutr**. 19(4):437-444, 2006.

LEVER, R.; HOULT, J.R.S.; PAGE, C.P. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. **Br J Pharmacol**. 129: 533–540, 2000.

LEVER, R; LO, W.T.; FARAIDOUN, M.; AMIN, V.; BROWN, R.A.; GALLAGHER, J.; PAGE C.P. Size-fractionated heparins have differential effects on human neutrophil function in vitro. **Br J Pharmacol**. 151, 837–843, 2007.

LEVER, R.; SMAILBEGOVIC, A.; PAGE, C. P. Locally available heparin modulates inflammatory cell recruitment in a manner independent of anticoagulant activity. Eur J Pharmacol. 630: 137–144, 2010.

LEY, K.; CERRITO, M; ARFORS, K-E. Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in rabbit mesentery venules. **Am J Physiol**. 260: H1667 H1673, 1991.

LINDAHL, U.; THUNBERG, L.; BÄCKSTRÖM, G.; RIESENFELD, J.; NORDLING, K.; BJÖRK, I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. **J Biol Chem**. 259:12368–76, 1984.

LINHARDT, R. J.; RICE, K. G.; KIM, Y. S.; LOHSE, D. L.; WANG, H. M.; LOGANATHAN, D. Mapping and quantification of the major oligosaccharide components of heparin. **Biochem J**. 254: 781–787, 1988.

LINHARDT, R. J.; HUDSON, C. S. Award Address in Carbohydrate Chemistry. Heparin: structure and activity. **J Med Chem**. 46: 2551–2564, 2003.

LIU, HAIYING; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. J. Lessons learned from the contamination of heparin. **Nat Prod Rep**. 26: 313–321, 2009.

LOGANATHAN, D.; WANG, H. M.; MALLIS, L. M.; LINHARDT, R. J. Structural variation in the antithrombin III binding site region and its occurrence in heparin from different sources. **Biochemistry**. 29: 4362–4368, 1990.

LOWE, J. B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. **Curr Opin Cell Biol**. 15: 531–538, 2003.

LUSTER, A.D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**. 338: 436–445, 1998.

MAHADOO, J.; HIEBERT, L.; JAQUES, L.B. Vascular sequestration of heparin. **Thromb Res**. 12:79-90, 1977.

MARGETTS, P. Heparin and the peritoneal membrane. **Perit Dial Int**. 29: 16–19, 2009.

MILLER, S.J.; HOGGATT, A.M.; FAULK, W.P. Heparin regulates ICAM-1 expression in human endothelial cells: an example of noncytokine-mediated endothelial activation. **Thromb Haemost**. 80: 481±7, 1998.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol**. 24: 327-334, 2003.

MULLIGAN, M. S.; PAULSON, J. C.; DE FREES, S.; ZHENG, Z. L.; LOWE, J. B. Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependent lung injury. **Nature**. 364: 149-151, 1993.

NADER, H.B.; PINHAL, M.A.S.; BAÚ' E.C.; CASTRO, R.A.B.; MEDEIROS, G.F.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L.; TRINDADE, E.S.; SHINJO, S.K.; ROCHA, H.A.O.; TERSARIOL, I.L.S.; MENDES, A.; DIETRICH, C.P.. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Braz J Med Biol Res**. 346: 699-709, 2001.

NADER, H. B. ; LOPES, C. C. ; ROCHA, H. A. O. ; SANTOS, E. A. ; DIETRICH, C. P. Heparins and Heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr Pharm Des**. 10: 951-966, 2004.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**. 420: 846-852, 2002.

NELSON, R.M.; CECCONI, O.; ROBERTS, W.G.; ARUFFO, A.; LINHARDT, R. J.; BEVILACQUA, M.P. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. **Blood**. 82: 3253±8, 1993.

NORGARD-SUMNICHT, K.E.; VARKI, A. Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups. **J Biol Chem**. 270:12012–12024, 1995.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends Immunol**. 26: 157–165, 2005.

O'DELL, J.R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**. 350: 2591-602, 2004.

OHNMACHT, C.; PULLNER, A; ROOIJEN, N. V.; VOEHRINGER, D. Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. **J Immunol**. 179:4766-4774, 2007.

PACHALY, J.R.; BRITO, H.F.V. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. **A hora veterinária**. 20:59-65, 2000.

PAPA, A.; DANESE, S.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. Review article: potential therapeutic applications and mechanisms of action of heparin in inflammatory bowel disease. **Aliment. Pharmacol. Ther**. 14: 1403±1409, 2000.

PAPARELLA, D.; YAU, T.M.; YOUNG, E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. **Eur J Cardiothorac Surg**. 21:232–44, 2002.

PARISH, C. R.; HINDMARSH, E. J.; BARTLETT, M. R.; STAYKOVA, M. A.; COWDEN, W. B.; WILLENBORG, D. O. Treatment of central nervous system inflammation with inhibitors of basement membrane degradation. **Immunol Cell Biol**. 76: 104-113, 1998.

PARISH, C.R. The role of Heparam sulphate in inflammation. **Nature**. 6: 633-643. 2006.

PAVÃO, M. S. G. Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. **An Acad Bras Cienc**. 74:105-112, 2002.

PERRETTI, M.; PAGE, C. P. Heparin and inflammation: a new use for an old GAG? **Gut**. 47:14-15, 2000.

PERVIN, A.; GALLO, C.; JANDIK, K.A.; HAN, X. J.; LINHARDT, R. J. Preparation and structural characterization of large heparin-derived oligosaccharides. **Glycobiology**. 5: 83–95, 1995.

PORFIRE, A.S.; PÂRVU, A.E.; DAICOVICIU, D; LEUCUŢA, S.E. Evaluation of antiinflamatory activity of liposome encapsulated msuperoxide dismutase in rats peritonitis. **Farmacia**. 57: 412-423, 2009.

RAMDIN, L.; PERKS, B.; SHERON, N.; SHUTE, J.K. Regulation of interleukin-8 binding and function by heparin and alpha2-macroglobulin. **Clin Exp Allergy**. 28: 616±24, 1998.

RIETSCHEL E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**. 8:217-225, 1994.

ROSEN, S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. **Curr Opin Cell Biol**. 6:663–673, 1994.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annu. Rev. Immunol***.* 22: 891–928, 2004.

ROTHENBERG, M.E. Eosinophilia. **N Engl J Med**. 338:1592–600, 1998.

SALAS, A.; SANS, M.; SORIANO, A.; REVERTER, J.C.; ANDERSON, D.C.; PIQUE, J.M. et al. Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. **Gut**. 47: 88–96, 2000.

SALLUSTIO, B. C.; HOLBROOK, F. L. In vivo perturbation of rat hepatocyte canalicular membrane function by diclofenac. **Drug Metab Dispos***.* 29: 1535–1538, 2001.

SAWYER, R. G.; SPENGLER, M. D.; ADAMS, R. B.; PRUETT, T. L. The peritoneal environment during infection: the effect of monomicrobial and polymicrobial bacteria on pO2 and pH. **Ann Surg**. 213: 253–260, 1991.

SEEDS, E.A.M.; PAGE, C.P. Heparin inhibits allergen-induced eosinophil infiltration into guinea-pig lung via a mechanism unrelated to its anticoagulant activity. **Pulm Pharmacol Ther**. 14: 111–119, 2001.

SHAMRI, R.; GRABOVSKY, V.; GAUGUET, J-M.; FEIGELSON, S.; MANEVICH, E.; KOLANUS, W.; ROBINSON, M.K.; STAUNTON, D. E.; VON ANDRIAN, U.H.; ALON, R. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. **Nature Immunol***.* 6: 497-506, 2005.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**. 3: 385–405, 2004.

SILVESTRO, L.; VIANO, I.; MACARIO, M.; COLANGELO, D., MONTRUCCHIO, G.; PANICO, S. et al. Effects of heparin and its desulfated derivatives on leukocyte–endothelial adhesion. **Sem Thromb Haemost** 20:254–258, 1994.

SKINNER, M.P.; LUCAS, C.M.; BURNS, G.F.; CHESTERMAN, C.N.; BERNDT, M.C. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. **J Biol Chem**. 266: 5371–5374, 1991.

SMAILBEGOVIC, A.; LEVER, R.; PAGE, C.P. The effects of heparin on the adhesion of human peripheral blood mononuclear cells to human stimulated umbilical vein endothelial cells. **Br J Pharmacol**. 134: 827-836, 2001.

SPLETTSTOESSER, W.D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. **Microsc Res Tech**. 57: 441-455, 2002.

SUGAHARA, K.; KITAGAWA, H. Heparin and heparan sulfate biosynthesis. **IUBMB Life**. 54: 163-175, 2002.

TYRRELL, D.J.; HORNE, A.P.; HOLME, K.R.; PREUSS, J.M.H.; PAGE, C.P. Heparin in inflammation: Potential Therapeutic Applications beyond Anticoagulation. **Adv Pharmacol**.46:151 ± 189, 1999.

ULEVITCH, R.J.; TOBIAS, P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu Rev Immunol**. 13:437-457, 1995.

VANCHERI, C.; MASTRUZZO, C.; ARMATO, F.; TOMASELLI, V.; MAGRI, S.; PISTORIO, M.P. et al. Intranasal heparin reduces eosinophil recruitment after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**. 108: 703–708, 2001.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm res**. 47: S78–S87, 1998.

VARKI, A. Selectin ligands. **Proc Natl Acad Sci**. 91:7390-7397, 1994.

WALSH, R.; DILLON, T.; SCICCITANO, R.; MCLENNAN, G. Heparin and heparan sulphate are inhibitors of human leukocyte elastase. **Clin Sci**. 81: 341±6, 1991.

WANG, L.; BROWN, J. R.; VARKI, A.; ESKO J. D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. **J Clin Invest**. 110:127–136, 2002.

WELLER, P.F. Eosinophils: structure and functions. **Curr Opin Immunol**. 6:85–90, 1994.

WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.J.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**. 49:1618-1631, 2010.

XIE, X.; RIVIER, A-S; ZAKRZEWICZ, A; BERNIMOULIN, M; ZENG, X-L; WESSELI, H.P.; SCHAPIRA, M.; SPERTINI, O. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. **J Biol Chem**. 275: 34818-34825, 2000.

XIE, X.; THORLACIUS, H.; RAUD, J.; HEDQVIST, P.; LINDBOM, L. Inhibitory effect of locally administered heparin on leukocyte rolling and chemoattractant-induced firm adhesion in rat mesenteric venules in vivo. **Br J Pharmacol**. 122: 906-910, 1997.

YADAV, R., LARBI, K. Y., YOUNG, R. E. & NOURSHARGH, S. Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. **Thromb Haemost**. 90: 598-606, 2003.

YAMASAKI, T.; SEKO, Y.; TAMATANI, T.; MIYASAKA, M.; YAGITA, H.; OKUMARA, K. et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against adhesion molecules. **Am J Pathol**.143:410-8, 1993.

YOUNG, E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds, **Thromb Res.** 122: 743-52, 2008.