



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA – PGFAR
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO METOTREXATO E
DA CICLOSPORINA A, NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA
CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

**Trabalho apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Farmácia, com ênfase em Imunologia, na
Universidade Federal de Santa Catarina –
UFSC**

Aluno: Eduardo Monguilhott Dalmarco
Orientadora: Prof. Dra. Tânia Sílvia Fröde

Florianópolis (SC), agosto de 2003

“Não há derrota, senão aquela que vem de nós mesmos, assim como também não há barreira intransponível, senão a nossa própria fraqueza de propósitos.”

Ralph Wando Emerson (1803-1882)
Poeta americano

Dedico este trabalho aos meus pais Euclides e Sônia, meus irmãos Roberta e Rodrigo, aos meus avós Itamar e Maria Elis e a Juliana, o amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me guiou pelo caminho do sucesso e de realizações, mesmo que muitas vezes este caminho tenha parecido sinuoso;

Aos meus pais, irmãos, avós, minha gratidão eterna pelo carinho e incentivo que sempre me confortaram, nestes quase três anos de luta;

À Juliana, minha namorada, por demonstrar que o amor puro e verdadeiro existe e o quanto ele é importante em nossas vidas;

À minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde, por sua confiança em mim depositada, bem como pela sua atenção e amizade dispensadas desde o início das minhas atividades;

Aos meus colegas de laboratório, Marcelo, Denise, Silvana, Álvaro e principalmente à Vanessa, a qual me ajudou muito no início das minhas atividades;

À Dra. Maria Aparecida, à Cláudia Pinto Figueiredo e demais funcionários do laboratório de hemopatologia do HEMOSC, os quais me auxiliaram muito na fase de imuno-histoquímica e histologia do meu trabalho;

Aos meus amigos, Odilon e Patrícia, que por muitas vezes escutaram minhas lamentações e sempre me apoiaram;

Enfim, a todos as pessoas que, de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO	PÁG.
Lista de Abreviações.....	i
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	xv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1.HISTÓRICO DA INFLAMAÇÃO.....	01
1.2.PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	02
1.3.CÉLULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	08
1.3.1.Polimorfonucleares.....	08
1.3.2.Fagócitos mononucleares.....	09
1.4.MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	10
1.5. ENZIMAS CELULARES ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO.....	13
1.5.1.Mieloperoxidase.....	13
1.5.2.Adenosina-deaminase.....	14
1.6.MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO.....	15
1.6.1.Eicosanóides.....	15
1.6.2.Óxido nítrico.....	17
1.6.3.Citocinas.....	20
1.7.FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR.....	21
1.8.IMUNOSUPRESSORES.....	22
1.8.1.Metotrexato.....	22
1.8.2.Ciclosporina A.....	23
1.9.MODELO EXPERIMENTAL INFLAMATÓRIO.....	24
1.9.1.Pleurisia induzida pela carragenina.....	24

2.JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1.ANIMAIS.....	33
4.2.PROCEDIMENTO ANESTÉSICO.....	33
4.3.MODELO DE INFLAMAÇÃO UTILIZADO.....	33
• <i>Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....</i>	33
4.4.TÉCNICAS UTILIZADAS.....	35
4.4.1. <i>Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade pleural e no sangue total.....</i>	35
• <i>Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se o May-Grünwald-Giemsa.....</i>	35
4.4.2. <i>Contagem de macrófagos obtidos no lavado da cavidade pleural.....</i>	36
• <i>Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se a Hematoxilina-Eosina.....</i>	36
4.4.3. <i>Determinação do exudato na cavidade pleural.....</i>	37
4.4.4. <i>Determinação da permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins).....</i>	38
4.4.5. <i>Determinação da mieloperoxidase no lavado pleural.....</i>	38
4.4.6. <i>Determinação da adenosina-deaminase no lavado pleural.....</i>	39
4.4.7. <i>Análise quantitativa do nitrito/nitrato (NOx) no lavado pleural.....</i>	40
4.4.8. <i>Análise histológica dos órgãos (pulmão, baço, rins, fígado e coração).....</i>	41
• <i>Coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-Eosina.....</i>	42
4.4.9. <i>Determinação dos antígenos leucocitários (CD11a, CD18) por imunohistoquímica no pulmão e no baço.....</i>	43

4.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	46
4.5.1. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre a contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	46
4.5.2. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue total de camundongos com pleurisia.....	47
4.5.3 Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre a contagem de macrófagos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	48
4.5.4. Efeito do Metotrexato e Ciclosporina A, sobre os níveis de exsudação, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	49
4.5.5. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia.....	49
4.5.6. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre as concentrações da mieloperoxidase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	50
4.5.7. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre os níveis da adenosina-deaminase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	51
4.5.8 Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre a dosagem do nitrato/nitrito, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	51
4.5.9. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre os leucócitos teciduais (pulmão, baço, rins, fígado e coração) de camundongos com pleurisia.....	52
4.6.10. Efeito do Metotrexato e da Ciclosporina A, sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a/CD18, no pulmão e no baço de camundongos com pleurisia.....	53
4.6. FÁRMACOS E REAGENTES.....	53
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5. RESULTADOS.....	57
5.1. Efeito do metotrexato sobre a contagem total e diferencial do leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	57
5.2. Efeito do metotrexato sobre a contagem de macrófagos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	61
5.3. Efeito do metotrexato sobre a contagem total e diferencial de leucócitos na sangue de camundongos com pleurisia.....	62
5.4. Efeito do metotrexato sobre a exsudação na cavidade pleural de	

<i>camundongos com pleurisia.....</i>	62
<i>5.5. Efeito do metotrexato sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, baço, rins, fígado e coração) de camundongos com pleurisia.....</i>	65
<i>5.6. Efeito do metotrexato sobre as concentrações da mieloperoxidase, adenosina-deaminase e nitrato/nitrito no lavado pleural de camundongos com pleurisia.....</i>	66
<i>5.7. Efeito do metotrexato sobre a organização celular em tecidos (pulmão, baço, coração e rins) de camundongos com pleurisia.....</i>	68
<i>5.8. Efeito do metotrexato sobre a expressão de CD11a/CD18 em tecidos (pulmão e baço) de animais com pleurisia.....</i>	74
<i>5.9. Efeito da ciclosporina A sobre a contagem total e diferencial do leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</i>	81
<i>5.10. Efeito da ciclosporina A sobre a contagem de macrófagos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</i>	85
<i>5.11. Efeito da ciclosporina A sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia.....</i>	86
<i>5.12. Efeito da ciclosporina A sobre a exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....</i>	88
<i>5.13. Efeito da ciclosporina A sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, baço, rins, fígado e coração) de camundongos com pleurisia.....</i>	90
<i>5.14. Efeito da ciclosporina A sobre as concentrações da mieloperoxidase, adenosina-deaminase e nitrato/nitrito (NOx) no lavado pleural de camundongos com pleurisia.....</i>	91
<i>5.15. Efeito da ciclosporina A sobre a organização celular em tecidos (pulmão, baço, coração e rins) de camundongos com pleurisia.....</i>	93
<i>5.16. Efeito da ciclosporina A sobre a expressão de CD11a/CD18 em tecidos (pulmão e baço) de animais com pleurisia.....</i>	97
6. DISCUSSÃO.....	102
7. CONCLUSÕES.....	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
9. ANEXOS.....	135
<i>9.1. Aprovação pelo comitê de ética no uso de animais (CEAU).....</i>	136

9.2. <i>Artigos publicados em revistas indexadas</i>	137
--	-----

LISTA DE ABREVIACOES

5-HETE	Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico
$\alpha\chi\beta 2$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em granulócitos e monócitos. Sinônimo: CD11c/CD18
$\alpha 1\beta 2$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em todos os leucócitos. Sinônimos: CD11a/CD18 ou LFA-1
$\alpha 4\beta 7$	Ligante da molécula de adesão da família das imunoglobulinas (MAdCAM-1)
$\alpha M\beta 2$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em granulócitos e monócitos. Sinônimos: CD11b/CD18 ou Mac-1
$\alpha v\beta 3$	Ligante da molécula de adesão da família das imunoglobulinas (PECAM-1)
A4β1	Molécula de adesão da família das integrinas expressada em linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Sinônimos: CD49d/CD29 ou VLA-4
A4β7	Molécula de adesão da família das integrinas expressada em linfócitos e eosinófilos. Sinônimos: CD49d/ β 7 ou LPAM-1
a.c.	antes de Cristo
AA	Acido araquidônico
ADA	Adenosina-deaminase
ADA-1	Adenosina-deaminase tipo 1
ADA-2	Adenosina-deaminase tipo 2
ANCA	Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos
APC	Célula apresentadora de antígeno
Bcl-3	Família de genes relacionados a apoptose
BK	Bradicinina
C3a	Componente do complemento C3a
C3b	Componente do complemento C3b
C3bi	Componente do complemento C3bi
C5a	Componente do complemento C5a
C5b	Componente do complemento C5b
C9	Componente do complemento C9
CAMs	Moléculas de adesão da família das imunoglobulinas
CD102	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas expressada no endotélio

CD106	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas expressada no endotélio
CD11a	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em linfócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos
CD11b	Molécula de adesão da família das integrinas expressada em células mielóides e células matadoras naturais (<i>natural killer</i>)
CD11c	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em células mielóides
CD18	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em todos os leucócitos
CD26E	Molécula de adesão da família das selectinas, expressada no endotélio
CD29	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada nos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.
CD31	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressada em todos os leucócitos, endotélio e plaquetas
CD34	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em células progenitoras hematopoiéticas
CD43	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em todos os leucócitos exceto linfócitos B
CD49d	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada nos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos
CD49d/β_7	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em linfócitos e eosinófilos. Sinônimo: LPAM-1
CD54	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressada no endotélio e nos eosinófilos
CD62L	Molécula de adesão da família das selectinas, expressada em todos os leucócitos
CD62P	Molécula de adesão da família das selectinas, expressada em células endoteliais e plaquetas
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
c-Rel	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B

CSF	Fator de crescimento celular
CTL	Linfócito T citotóxico
d.c.	depois de Cristo
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	Àcido desoxirribonucléico
ELAM-1	Molécula de adesão da família das selectinas, expressada no endotélio
E-selectina	Selectina tipo E
ESL-1	Ligante da molécula de adesão do tipo E-selectina
Fator XII	Fator XII da coagulação
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GlyCAM-1	Molécula de adesão do tipo integrina, expressada em vênulas
GMP-140	Molécula de adesão do tipo selectina, expressada em células endoteliais e plaquetas
GMPc	Guanosino monofosfato cíclico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HETE	Àcido hidroxiieicosatetraenóico
HOCL	Hipoclorito
HPETE	Àcido hidroxiperoxiieicosatetraenóico
IκB-α	Subunidade inibitória (α) do fator de transcrição nuclear
IκB-β	Subunidade inibitória (β) do fator de transcrição nuclear
IκB-ϵ	Subunidade inibitória (ϵ) do fator de transcrição nuclear
IκB-γ	Subunidade inibitória (γ) do fator de transcrição nuclear
ICAM-1	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressada em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas
ICAM-2	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressada em linfócitos, monócitos e células endoteliais vasculares
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-1Ra	Antagonista do receptor da interleucina 1

IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
INF-λ	Interferon λ
LAM-1	Molécula de adesão do tipo selectina, expressada em todos os leucócitos
LECAM-1	Molécula de adesão do tipo selectina, expressada em todos os leucócitos
LFA-1	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em todos os leucócitos. Sinônimo: LFA-1
LPAM-1	Molécula de adesão do tipo integrina, expressada nos linfócitos e eosinófilos
L-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressada em todos os leucócitos
LT	Leucotrieno
LTA₄	Leucotrieno A ₄
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTC₄	Leucotrieno C ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
LTE₄	Leucotrieno E ₄
Mac-1	Integrina composta pelas subunidades CD11b e CD18
MAdCAM-1	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressada em células endoteliais da placa de payer
MCP-1	Proteína quimioatratante de monócitos – 1
MEL-14Ag	Molécula de adesão do tipo selectina expressada em todos os leucócitos
MTX	Metotrexato
NADPH	Glutaciona redutase
NF-κB	Fator de transcrição nuclear NF-kappa B
NO	Óxido nítrico
NOc	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressada em células endoteliais
NOS I	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressada em células neuronais

NOS II	Óxido nítrico sintase induzida
NOS III	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressada em células endoteliais
NOS_e	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressada em células endoteliais
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS_n	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressada em células neuronais
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Radical superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
p100	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
p105	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
P50	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
P52	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
PADGEM	Molécula de adesão do tipo selectina, expressada em células endoteliais e plaquetas
PAF-acéter	Fator agregante de plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adesão do tipo imunoglobulina, expressada nos leucócitos, endotélio e plaquetas
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₁	Prostaglandina E ₁
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaglandina ou Prostaciclina I ₂
PGs	Prostaglandinas
P-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressada em células endoteliais e plaquetas
PSGL-1	Ligante das molécula de adesão P-selectina, expressada em todos os leucócitos
Rel A (p65)	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
Rel B	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B

RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	Radicais livres do oxigênio
TGF-β	Fator transformador de crescimento β
Th	Linfócito T auxiliar
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TX	Tromboxanos
TXA₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adesão do tipo imunoglobulina, expressada no endotélio
VLA-4	Molécula de adesão da família das integrinas, expressada em monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Sinônimo: CD49d/Cd29

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1 - Interações celulares envolvendo a indução da resposta imune.....	03
Figura 2 - Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória.....	05
Figura 3 - Quimiotaxia de leucócitos para os sítios inflamatórios.....	08
Figura 4 - Interações entre os leucócitos e a expressão de moléculas de adesão no vaso.....	11
Figura 5 - Metabolismo do ácido araquidônico e liberação dos eicosanóides.....	16
Figura 6 – Modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina (0 a 100 h) após a administração da carragenina na cavidade pleural de camundongos.....	28
Figura 7 - Efeito do metotrexato (1 – 40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos.....	58
Figura 8 - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado de 0,5 a 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos.....	59
Figura 9 - Efeito do metotrexato (1 – 40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos.....	60
Figura 10 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.) sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos.....	61

Figura 11 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de macrófagos na cavidade pleural de camundongos.....	62
Figura 12 – Efeito do metotrexato (1 - 40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de exudação na cavidade pleural de camundongos.....	65
Figura 13 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de exudação na cavidade pleural de camundongos.....	65
Figura 14 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos.....	66
Figura 15 - Efeito do metotrexato (20 e 40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis da mieloperoxidase na cavidade pleural de camundongos.....	68
Figura 16 - Efeito do metotrexato (20 e 40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis da adenosina-deaminase na cavidade pleural de camundongos.....	68
Figura 17 - Efeito do metotrexato (20 e 40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de nitrato/nitrito na cavidade pleural de camundongos.....	69

Figura 18 – Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e organização celular nos pulmões de camundongos.....	70
Figura 19 – Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) adminitrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular nos pulmões de camundongos.....	71
Figura 20 - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no fígado de camundongos.....	72
Figura 21 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, sobre a infiltração e a organização celular no fígado de camundongos.....	73
Figura 22 - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no baço de camundongos.....	74
Figura 23 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no baço de camundongos.....	75
Figura 24 – Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no pulmão de camundongos.....	76

Figura 25 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no pulmão de camundongos.....	77
Figura 26 - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no pulmão de camundongos.....	78
Figura 27 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no pulmão de camundongos.....	78
Figura 28 - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no baço de camundongos.....	79
Figura 29 - Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no baço de camundongos.....	80
Figura 30 - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no baço de camundongos.....	81
Figura 31 – Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no baço de camundongos.....	81

- Figura 32 – Efeito da ciclosporina A (0,1 - 20 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos..... 82
- Figura 33 – Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 a 4 h antes da administração da carragenina (Cg, 1%/cav.) na primeira (4 h) fase da pleurisia, sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos..... 83
- Figura 34 – Efeito da ciclosporina A (0,1 – 5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos..... 84
- Figura 35 - Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 - 4 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos..... 85
- Figura 36 - Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de macrófagos na cavidade pleural de camundongos..... 86
- Figura 37 - Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos..... 87
- Figura 38 - Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos..... 88
- Figura 39 - Efeito da Ciclosporina A (0,5 - 5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, sobre os níveis de exudação na cavidade pleural de

camundongos.....	89
Figura 40 - Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada de 0,5 a 4 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, sobre os níveis de exudação na cavidade pleural de camundongos.	90
Figura 41 - Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos.....	91
Figura 42 - Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis da mieloperoxidase na cavidade pleural de camundongos.....	93
Figura 43 - Efeito da Ciclosporina A (1 e 2 mg/kg, i.p.) administrada 1 e 0,5 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre os níveis de nitrato / nitrito na cavidade pleural de camundongos.....	93
Figura 44 - Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e organização celular nos pulmões de camundongos.....	94
Figura 45 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e organização celular nos pulmões de camundongos.....	95
Figura 46 – Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no fígado de camundongos.....	96

Figura 47 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no fígado de camundongos.....	96
Figura 48 – Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no baço de camundongos.....	97
Figura 49 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a infiltração e a organização celular no baço de camundongos.....	98
Figura 50 – Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no pulmão de camundongos.....	99
Figura 51 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no pulmão de camundongos.....	99
Figura 52 – Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no pulmão de camundongos.....	100
Figura 53 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no pulmão de camundongos.....	100

Figura 54 – Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no baço de camundongos.....	101
Figura 55 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a no baço de camundongos.....	101
Figura 56 – Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes do agente flogístico, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no baço de camundongos.....	102
Figura 57 – Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do agente flogístico, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), sobre a expressão de moléculas de adesão CD18 no baço de camundongos.....	102

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1 – Moléculas de adesão envolvidas nas interações entre os leucócitos e o endotélio.....	12
Tabela 2 – Resumo das principais funções fisiológicas e inflamatórias dos mediadores eicosanóides.....	17

Análise da atividade antiinflamatória do metotrexato e ciclosporina A, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Introdução: A pleurisia induzida pela carragenina (Cg) é um modelo de inflamação bifásico pelo qual ocorre aumento significativo de exudação e de leucócitos, às custas de neutrófilos 4 h após a indução da pleurisia, esta também é denominada de fase recente da inflamação. A segunda fase, ou fase tardia ocorre 48 h após e é caracterizada também pelo aumento significativo da exudação e de leucócitos às custas de mononucleares.

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de imunossuppressores (metotrexato: MTX e ciclosporina A: CsA) sobre os parâmetros inflamatórios (leucócitos, exudação, enzimas e moléculas de adesão: CD11a e CD18), em ambas as fases (4 e 48 h) deste modelo experimental.

Resultados: Ambos os fármacos foram capazes de inibir significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela Cg ($P < 0,05$). Além disso, tanto o MTX como a CsA inibiram também a exudação e os níveis de macrófagos na pleurisia induzida pela Cg 48 h ($P < 0,01$). Em relação à permeabilidade vascular observamos que ambos os fármacos inibiram de forma significativa a exudação pulmonar 4 e 48 h após ($P < 0,05$). O MTX e a CsA também inibiram as concentrações de MPO 4 h após a indução da pleurisia ($P < 0,05$). Por sua vez, na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória apenas o MTX inibiu os níveis da MPO ($P < 0,01$). Ao estudarmos os metabólitos do óxido nítrico, observamos que tanto o MTX como a CsA inibiram de forma significativa este mediador inflamatório na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela Cg ($P < 0,01$). Por outro lado o MTX aumentou ou diminuiu os níveis da ADA na pleurisia 4 e 48 h, respectivamente ($P < 0,05$). Em relação a infiltração de leucócitos teciduais ambos os fármacos inibiram a migração destas células para os pulmões, fígado e baço na pleurisia induzida pela carragenina 4 e 48 h ($P < 0,01$). Nas mesmas condições experimentais, ambos os fármacos inibiram a expressão de CD11a nos pulmões (4 e 48 h) ($P < 0,01$) e no baço (4 h) ($P < 0,01$). Além disso, o MTX, mais não a CsA inibiu a expressão de CD11a no baço 4 h após a indução da pleurisia ($P < 0,01$). Em relação a molécula de adesão CD18, tanto o MTX como a CsA inibiram a expressão desta integrina nos pulmões e baço (4 h) após a indução da pleurisia ($P < 0,01$). Além disso, a CsA e o MTX, foram capazes de inibir a expressão desta molécula de adesão no baço na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória. Já em relação à expressão desta molécula de adesão (CD18) nos pulmões na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória, apenas a CsA foi capaz de inibir significativamente este parâmetro ($P < 0,01$).

Conclusão: Estes resultados suportam importantes evidências que tanto o MTX como a CsA, nas doses testadas possuem importantes propriedades antiinflamatórias, agindo principalmente sobre a migração leucocitária, exudação e enzimas que participam da resposta inflamatória no modelo da pleurisia induzida pela Cg, em camundongos.

Anti-inflammatory effects of metotrexate and cyclosporin A, in the mouse model of pleurisy.

Introduction: The mouse model of pleurisy is characterized by a significant enhancement of exudation and cell migration, due to neutrophils 4 h after pleurisy induction. This phase is named of early phase. The late phase (48 h) occur 48 h after pleurisy induction and it is characterized by a significant increase of exudation and cell migration due to mononuclear cells.

Objective: The aim of this work was to analyse the effect of Methotrexate: MTX and Cyclosporin A: CsA on the early (4 h) and late (48 h) phases on the pleurisy induced by Cg in mice.

Results: The results showed that either MTX or CsA were effective in inhibiting the cell migration on both phases (4 e 48 h) into the mouse pleural cavity ($P < 0.05$). Furthermore, MTX and CsA also inhibited the exudation and the macrophages on the pleurisy induced by Cg 48 h after ($P < 0.01$). Furthermore, these drugs inhibited the exudation in the lung on the early (4 h) and late (48 h) phases of this pleural inflammation ($P < 0.01$). It is important to comment that MTX and CsA also decreased MPO levels 4 h after pleurisy induction ($P < 0.05$). On the other hand, only MTX inhibited this enzyme 48 h after ($P < 0.01$). In relation to (NO) metabolites, we observed that MTX and CsA inhibited significantly the NO levels 4 e 48 h after pleurisy induction ($P < 0.01$). Furthermore, MTX increased or decreased the ADA concentration on the early (4 h) or late (48 h) phases on this inflammatory process, respectively ($P < 0.05$). In the tissues, both drugs decreased significantly leukocyte influx to the lung, spleen and liver on both phases (4 and 48 h) of the pleurisy induced by Cg ($P < 0.01$). On the same conditions, MTX and CsA inhibited the CD11a expression on the lungs (4 and 48 h) ($P < 0.01$) and in the spleen (4 h) ($P < 0.01$). Furthermore, MTX but not CsA inhibited the CD11a expression into the spleen 48 h after ($P < 0.01$). In relation to the CD18 expression, both drugs inhibited significantly this integrin into the spleen 4 and 48 h after ($P < 0.01$) and lung (4 h) ($P < 0.01$). CsA but not MTX, decreased the CD18 expression in the lungs 48 h after pleurisy induction ($P < 0.01$).

Conclusion: These results support the evidence that MTX and CsA at the studied doses have an important anti-inflammatory properties, acting primarily on the leukocyte migration, exudation and enzymes that participate of the inflammatory response induced by Cg into the mouse pleural cavity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA INFLAMAÇÃO

A expressão inflamação, foi designada pelos egípcios, e relatada em papiro em 2500 a.c. Segundo documentos datados de 600 a.c., os povos do Oriente Médio também utilizavam esta palavra. Inicialmente o termo inflamação, derivou-se de figuras entalhadas em pedra, cujo significado era “explodir”. Além disso, a associação entre explodir, fogo e inflamação foi utilizada também por outros povos, como os Sumérios (700 a.c.). Desta forma, o termo médico para inflamação foi derivado de figuras que expressavam as sensações de “quente e calor” (CONE, 2001).

Celcius no primeiro século (d.c.), recebeu os méritos por ter reconhecido e descrito os sinais que são adotados hoje como, sinais cardinais da inflamação: rubor (vermelhidão), tumor (edema), calor e dor. E Galeno (130-200 d.c.), conceituou este processo como uma reação que ocorre no corpo humano, contra a ação de alguma substância ou corpo estranho. Além disso, adicionou o quinto sinal cardinal, o que ele chamou de *functio laesa*, ou perda da função. A partir daí, este pesquisador sugeriu, que o papel da inflamação seria relacionado principalmente à defesa do organismo (CONE, 2001).

Nos primeiros séculos após Cristo, o conceito moderno de inflamação não diferiu da definição defendida por Celsius: eritema, calor, dor, edema e perda da função. Hoje em dia, conhece-se bem estes sinais em nível microscópico, o que nos permitiu descobrir que são resultados da vasodilatação, do acúmulo de leucócitos, do aumento no fluído intersticial e da estimulação na liberação de mediadores inflamatórios (CONE, 2001).

1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O sistema imune dos mamíferos possui inúmeros mecanismos de defesa, contra a invasão de microrganismos, trauma e até neoplasias. Este também possui, a capacidade de remover proteínas desnaturadas e células que perderam sua função. O sistema imune é composto pelo timo, pela medula óssea e pelo baço, com seus bilhões de células as quais possuem a função de captura, reconhecimento de antígenos e proteção do tecido hospedeiro (ALI et al.,1997).

A reação inflamatória, envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, para sua posterior destruição. O reconhecimento, desencadeia a ativação e a amplificação do sistema e como resultado ocorre a ativação de células e a liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória.

Dependendo do reconhecimento e do tipo dos mediadores liberados, diferentes tipos de resposta podem ocorrer (celular ou humoral). Dentre estas podemos destacar: 1) O recrutamento e a ativação de linfócitos e fagócitos, que são importantes componentes da inflamação; 2) A fagocitose pelos fagócitos e a geração de produtos tóxicos, como enzimas proteolíticas, metabólitos do oxigênio e proteínas catiônicas que são responsáveis pela destruição dos microrganismos invasores no tecido hospedeiro, entre outras (CHIZZOLINI et al., 2000; LATEY, 2001).

O recrutamento e a ativação de linfócitos também é importante na inflamação, além de serem os “comandantes desta resposta“, quando o estímulo requer a produção de anticorpos para sua destruição (Figura 1).

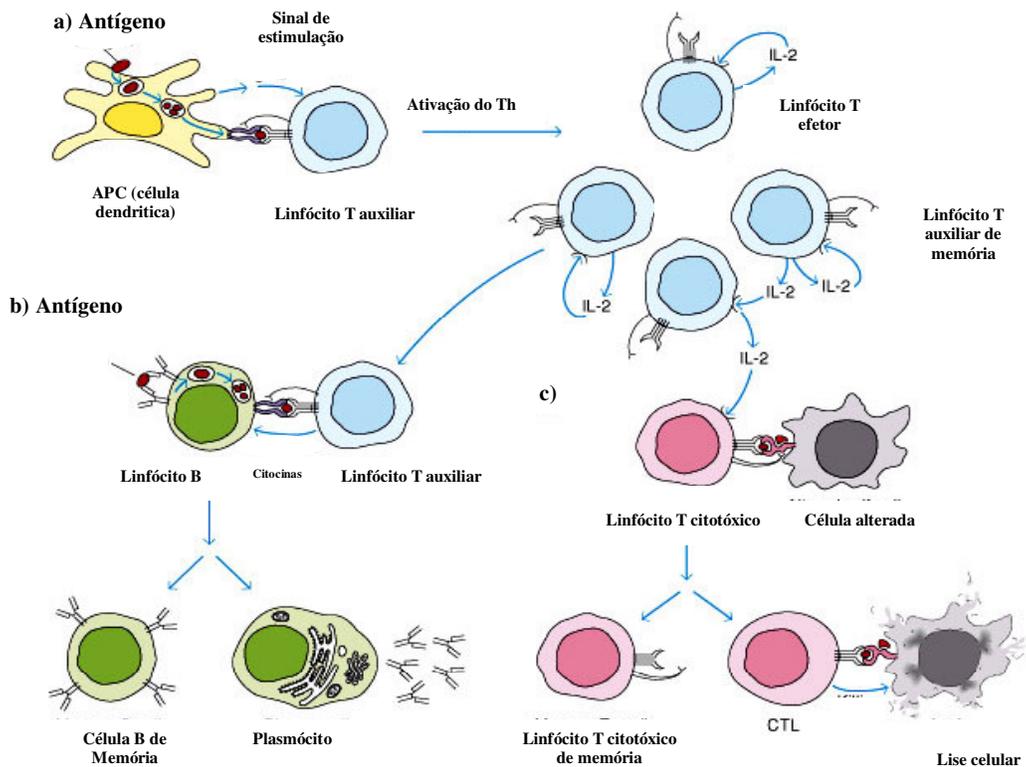


Figura 1 -Interações celulares envolvendo a indução da resposta imune. A ativação e a proliferação das células T auxiliares (T_H) (a) é necessária para a ativação da resposta humoral (b) e resposta mediada por células (c). Retirado e adaptado de GOLDSBY et al. Disponível em < <http://www.whfreeman.com/immunology/CH01/lymphocyteactivation.htm> >. Acesso em 18/06/2003.

Todas as etapas da reação inflamatória são orquestradas por interações complexas entre o que chamamos de mediadores do processo inflamatório. Atualmente, são conhecidos inúmeros mediadores, dentre eles podemos destacar: aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas, sistema complemento como por exemplo C3a, C5a-C5b-C9, componentes da coagulação e de fibrinólise (fibrino-peptídeos, produtos da degradação da fibrina, entre outros), metabólitos do ácido araquidônico (AA) como os produtos da via da ciclooxygenase (COX), incluindo endoperóxidos, prostaglandinas

(PGs) e tromboxanos (TX) e da lipooxigenase (leucotrienos (LT), ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóico (HPETE) e hidroxieicosatetraenóico (HETE), radicais livres derivados do oxigênio, fator agregante de plaquetas (PAF-acéter), óxido nítrico (NO), citocinas, entre outros (BARNES et al., 1998; ROCCA e FITZGERALD, 2002; CHAKRABORTI, 2003).

De modo didático, a resposta inflamatória é categorizada em três fases distintas, cada uma delas sendo mediada aparentemente por mecanismos diferentes. Assim, é inicialmente evidenciada uma fase aguda, de duração variável, em que ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas e posteriormente, ocorre regeneração tecidual ou fibrose. Cada uma destas fases estudadas pode ser dividida em várias etapas que são apresentadas na Figura 2. Na primeira fase da reação inflamatória, o aumento do fluxo sangüíneo na área lesada, devido à dilatação e engurgitamento dos capilares e arteríolas, bem como do recrutamento adicional de outros vasos que normalmente estão hipofuncionantes, é responsável pelo eritema ou rubor da área comprometida. Além disso, pode ocorrer também elevação da temperatura local (calor) (LATEY, 2001). A vasodilatação se deve à ação de mediadores, em nível arteriolar e venular. É reconhecido que os mediadores liberados nesta fase são inúmeros, dentre eles, citam-se as cininas, a histamina, a serotonina, os leucotrienos, o PAF-acéter, a fração C5a do sistema complemento, as prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α}) e as substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (as taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP) (HEDQVIST et al., 2000; LECCI et al., 2000). O exsudato formado

facilita a liberação de outros mediadores, o que amplifica a resposta inflamatória.

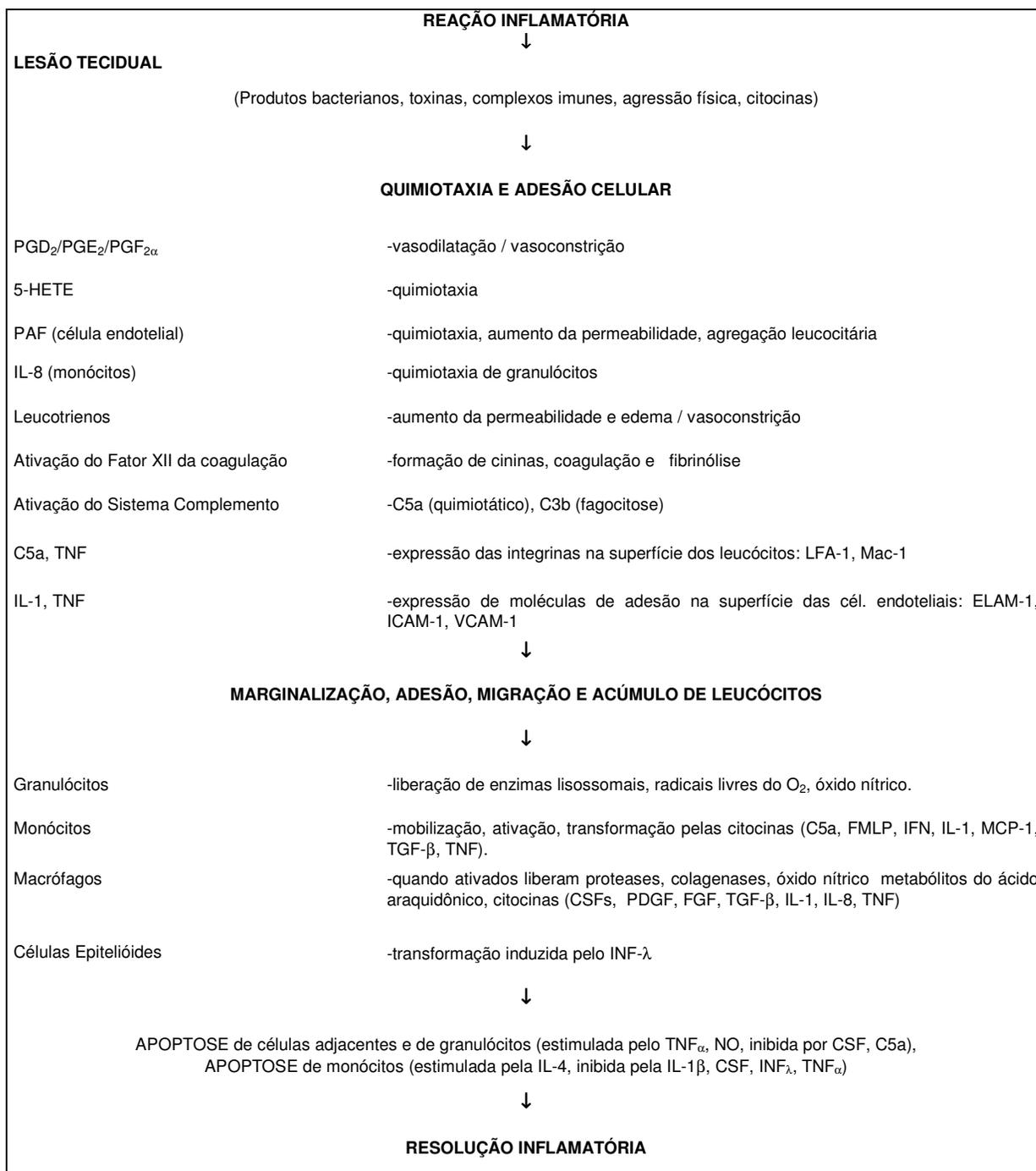


Figura 2- Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória.

A segunda fase da resposta inflamatória é caracterizada pela migração de leucócitos e de outras células fagocíticas para o sítio da lesão. De um modo geral, denomina-se de quimiotaxia o processo pelo qual as células leucocitárias são atraídas para o sítio do processo inflamatório. Estes fatores quimiotáticos são gerados tanto na corrente sangüínea quanto no sítio da lesão. Assim, o sistema complemento e as cininas são considerados importantes fatores quimiotáticos de origem plasmática (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS, et al., 2002). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo. Entre os leucócitos, os neutrófilos possuem papel importante nesta fase da reação inflamatória.

Existem muitas revisões demonstrando que na vigência de certas reações inflamatórias ocorre a ativação do sistema complemento com a liberação do fragmento C5a, que é quimiotático para os neutrófilos (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS et al., 2002). Por exemplo, quando anticorpos específicos interagem com a superfície de um microorganismo patógeno, o complexo antígeno-anticorpo formado estimula a proteólise dos componentes da via clássica do sistema complemento. Através de reações bioquímicas e enzimáticas, proteínas precursoras são clivadas em fragmentos que, por sua vez, vão ativar outros componentes do sistema complemento. As principais proteínas deste sistema, que são liberadas no plasma e que participam da quimiotaxia são os componentes C3a e C5a (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS et al., 2002). Outros eventos como a desgranulação local de mastócitos e a indução da agregação plaquetária podem resultar na liberação de mediadores que são quimiotáticos para macrófagos e monócitos (BUSSE e LEMANSKE, 2001; HE et al., 2002; HOLGATE, 2002). Entre os

mediadores considerados quimiotáticos, citam-se: PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}, 5-HETE, cininas, fibrino-peptídeos, peptídeos liberados por neutrófilos e o leucotrieno B₄ (LTB₄), entre outros (ROCCA e FITZGERALD, 2002; EVANS et al., 2003).

Paralelamente, com a geração plasmática ou no sítio da lesão de fatores quimiotáticos, juntamente com a vasodilatação local, ocorrem mudanças na distribuição dos componentes celulares em relação ao fluxo sanguíneo (SIEGELMAN et al., 2000). Nesta condição, os leucócitos, que normalmente circulam no centro da luz vascular, passam a ser detectados nas proximidades da parede do vaso, sendo este processo denominado de marginalização leucocitária. Além disso, a migração celular é facilitada pela expressão de moléculas de adesão em diferentes tipos de células (JUNG et al., 1998; SIEGELMAN et al., 2000). Estas moléculas são expressas por estímulos gerados no sítio do processo inflamatório e têm sido identificadas tanto em leucócitos, macrófagos, fibroblastos, plaquetas como em células endoteliais (JUNG et al., 1998; SIEGELMAN et al., 2000). É reconhecido, atualmente, que os fatores quimiotáticos que estimulam tanto os leucócitos como as células endoteliais a expressar moléculas de adesão facilitam, em última análise, a adesividade entre estas células, processo este conhecido como *rolling* (WALZOG et al., 1999). A adesão posterior dos granulócitos à parede do endotélio facilita a migração destas células para o foco da lesão (Figura 3).

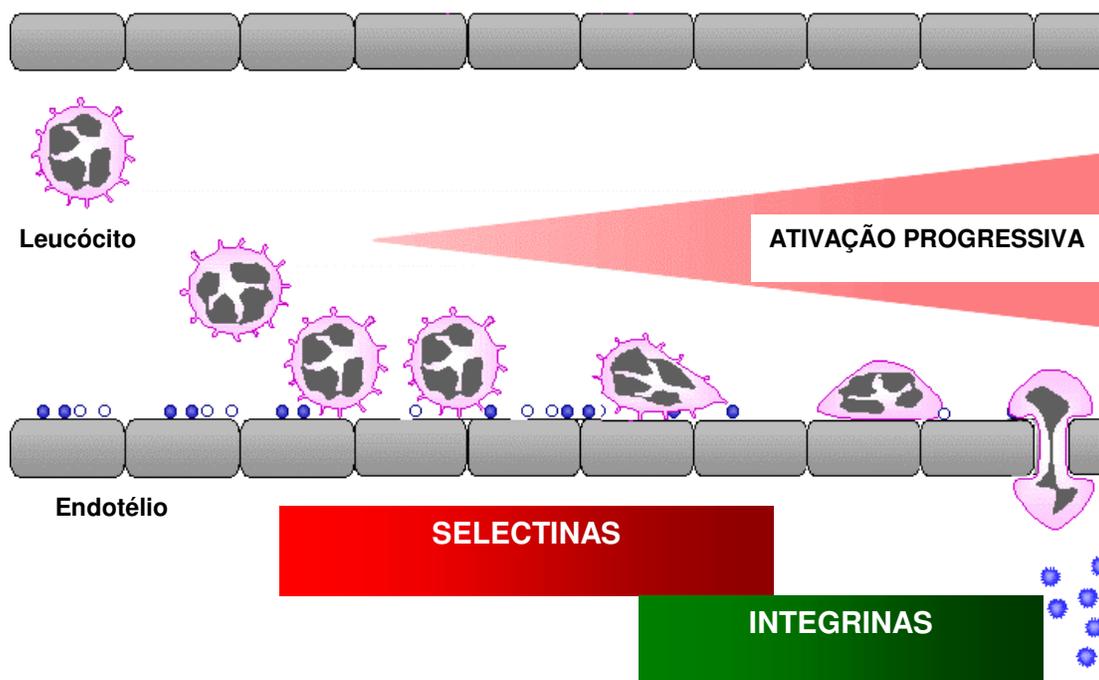


Figura 3 – Quimiotaxia de leucócitos para sítios inflamatórios. As selectinas e as integrinas expressas nos leucócitos atuam em seqüência, se sobrepondo. O uso de diferentes moléculas pode gerar alguma especificidade no recrutamento de células inflamatórias. Fatores quimiotáticos são necessários tanto para a ativação bem como para a migração transendotelial de leucócitos. Retirado e adaptado de GAHMBERG et al. Leukocyte adhesion group. Disponível em <<http://www.helsinki.fi/ml/biotiet/biokemia/lag/index.html>>. Acesso em 23 de junho de 2003.

1.3 CÉLULAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

1.3.1 POLIMORFONUCLEARES

Os leucócitos polimorfonucleares são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio da lesão tecidual em processos inflamatórios, são eles os responsáveis, junto com os macrófagos, pela fagocitose e destruição do agente causador da inflamação (BIASI et al., 2003). Após a migração dos polimorfonucleares dos vasos até o sítio inicial da inflamação, ocorre o reconhecimento e a fagocitose do agente estranho causador da agressão, pelos polimorfonucleares e macrófagos. Em seguida, já dentro do citoplasma

destas células, o agente estranho é fundido a fagolisossomas, os quais contêm enzimas com função de destruição do mesmo. Dentre estas enzimas, podemos destacar a mieloperoxidase, uma protease presente em neutrófilos e monócitos (RODRIGUES et al., 2002).

A migração de leucócitos para o sítio da inflamação é um acontecimento comum em diversas patologias. O acréscimo do número de polimorfonucleares nos pulmões, tem sido detectado em pacientes com doenças inflamatórias, como a pneumonia e a doença obstrutiva crônica pulmonar. O aumento de polimorfonucleares ativados em tecidos, promove uma lesão decorrente da liberação de suas substâncias tóxicas, incluindo proteases e espécies reativas do oxigênio (ROS), resultando na progressão da doença (RIDGER, et al. 2001). A redução na migração de polimorfonucleares para os pulmões nestes pacientes parece ter um valor terapêutico importante, embora o conhecimento sobre as etapas envolvendo a migração celular e a lesão tecidual não estarem totalmente elucidadas (RIDGER, et al. 2001).

1.3.2 FAGÓCITOS MONONUCLEARES

O sistema fagocítico mononuclear possui duas funções principais, realizadas por dois tipos celulares distintos: os macrófagos, cuja função predominante é remover antígenos particulados; e as células apresentadoras de antígeno (APC), cuja função é internalizar e apresentar o antígeno aos linfócitos T (KIM et al., 2003).

Os monócitos circulantes no sangue quando necessário, migram para o tecido em resposta a um estímulo lesivo, onde então se transformam em macrófagos, e fagocitam ativamente organismos, bem como células tumorais. Os macrófagos fagocitam o agente agressor, pois possuem receptores

específicos. O antígeno se liga aos macrófagos por meio de produtos do sistema complemento (C3b) e as imunoglobulinas do tipo IgG, se aderem à membrana celular microbiana (ROSENBERGER e FINLAY, 2003).

1.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO

Durante o processo inflamatório, existem a liberação de substâncias conhecidas como quemocinas, as quais são responsáveis por direcionar as células inflamatórias para o foco da inflamação (CASCIERI e SPRINGER, 2000). No entanto, para que os leucócitos possam atravessar a parede dos vasos sanguíneos, migrarem através dos tecidos e chegarem no foco inflamatório, é necessário a expressão de glicoproteínas de membrana, conhecidas como moléculas de adesão (LEY et al, 1998). Após a expressão destas moléculas na parede interna dos vasos sanguíneos e também nos leucócitos, ocorre ainda uma cascata de eventos. O primeiro passo envolve uma interação fraca entre os leucócitos circulantes e a parede interna dos vasos, a qual é mediada pela família de moléculas de adesão denominada de selectinas, esta etapa também é conhecida como *rolling*. A seguir, o estágio inicial evolui para uma aderência firme entre os leucócitos e a parede interna dos vasos, pelo qual é mediada pelas integrinas e pela superfamília das imunoglobulinas (CAMs). Após estabelecida esta segunda fase, os leucócitos encontram-se aptos a atravessarem a parede dos vasos em direção ao estímulo quimiotático, etapa esta, também conhecida como transmigração endotelial (Figura 4) (PANÉS, 1999; MÜLLER, 2003).

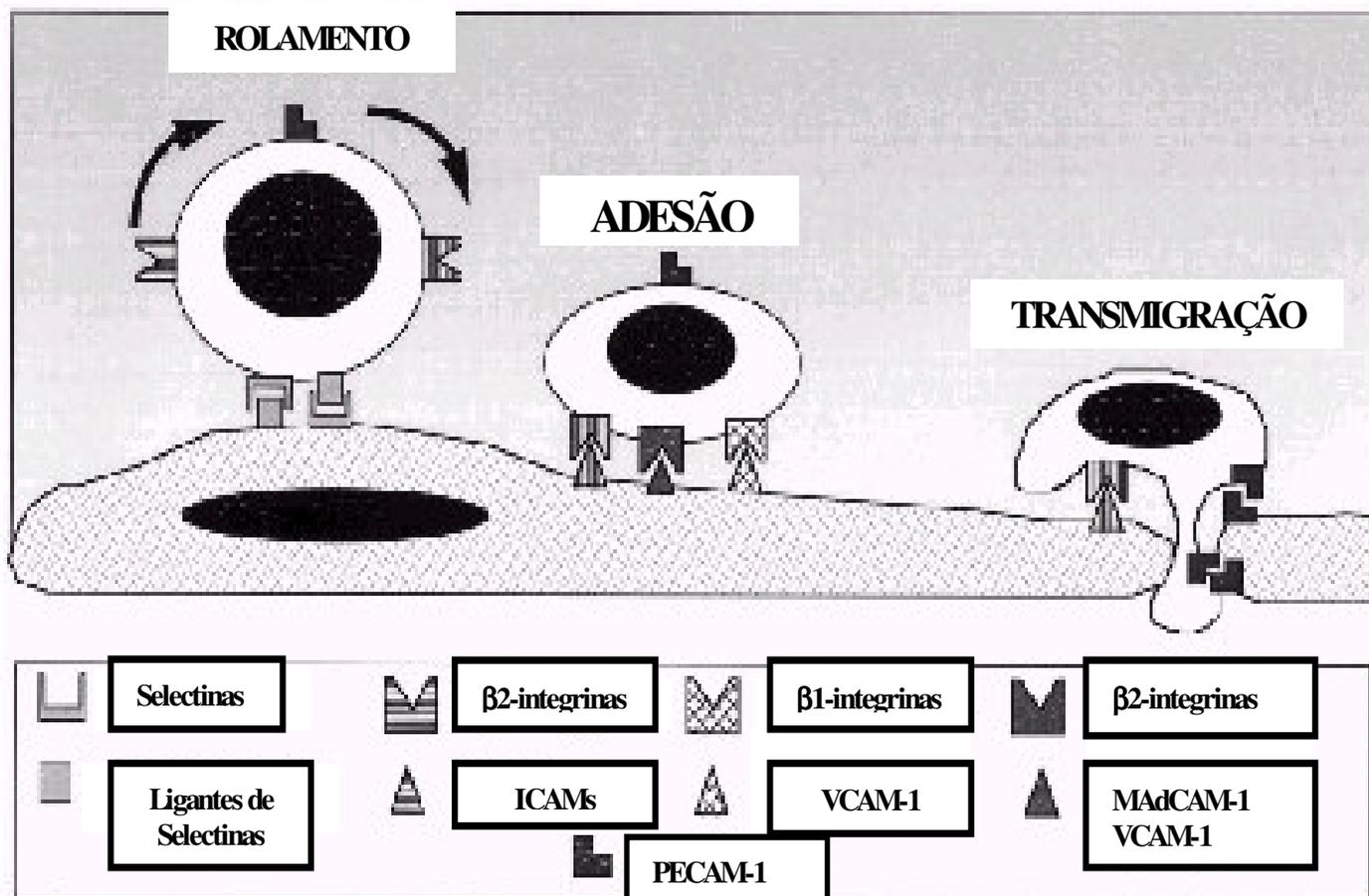


Figura 4 – Interações entre os leucócitos e a expressão das moléculas de adesão no vaso. Rolamento, adesão, migração transendotelial, selectinas, integrinas e ligantes das moléculas de adesão. Adaptado de VERDIER, C. Rolling, adhesion and transmigration of a leucocyte on the endothelium lining. Disponível em < <http://rheologie.ujf-grenoble.fr/~verdier/interests.html>>. Acesso em 23 de junho de 2003.

Na tabela 1, estão resumidas as principais famílias de moléculas de adesão envolvidas em processos inflamatórios com suas respectivas funções.

Tabela 1 – Moléculas de adesão envolvidas na resposta inflamatória, e sua interação com os leucócitos e o endotélio.

INTERAÇÕES ENDOTÉLIO-LEUCÓCITOS - PROTEÍNAS DE ADESÃO				
Moléculas de Adesão	Designação Alternativa	Localização	Ligante	Função
Família das Selectinas				
L-selectina	LAM-1, LECAM-1, MEL-14Ag, CD62L	todos leucócitos	P-selectina, E-selectina, GlyCAM-1, CD34, MAdCAM	Rolamento
P-selectina	PADGEM, GMP-140, CD62P	células endoteliais, plaquetas	L-selectinas, PSGL-1	Rolamento
E-selectina	ELAM-1, CD26E	células endoteliais	L-selectinas, PSGL-1, ESL-1	Rolamento
Família das Integrinas				
$A_1\beta_2$	CD11a/CD18, LFA	todos leucócitos	ICAM-1, ICAM2	Adesão, Migração
$\alpha_M\beta_2$	CD11b/CD18, Mac-1	granulócitos, monócitos	ICAM-1, C3bi, fibrinogênio	Adesão
$\alpha_x\beta_2$	CD11c/CD18	granulócitos, monócitos	VCAM-1, fibronectina	Adesão
$A_4\beta_1$	CD49d/CD29/VLA-4	linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos	VCAM-1, fibronectina	Adesão
$A_4\beta_7$	CD49d/ β_7 , LPAM-1	linfócitos, eosinófilos	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectina	Adesão
Superfamília das Imunoglobulinas				
ICAM-1	CD54	endotélio, monócitos	LFA-1, Mac-1, CD43	Adesão, Migração
ICAM-2	CD102	endotélio	LFA-1	Adesão, Migração
VCAM-1	CD106	endotélio	VLA-4	Adesão
PECAM-1	CD31	endotélio, leucócitos, plaquetas	PECAM-1 (homofílico) $\alpha_x\beta_3$ (heterofílico)	Adesão, Migração
MAdCAM-1	-	endotélio	L-selectina, $\alpha_4\beta_7$	Adesão, Migração

Moléculas de adesão envolvidas nas interações entre os leucócitos e o endotélio. (ELAM – adesão leucócito-endotélio); ESL (*ligante da E-selectina*); GMP (*proteína granular de membrana*); LAM (*molécula de adesão leucocitária*); LECAM (*molécula de adesão celular linfócito-endotélio*); LFA (*antígeno relacionado a função linfocitária*); PADGEM (*proteína granular de membrana dependente da ativação plaquetária*). Adaptado de STVRTINOVÁ et al. Inflammation and fever. Disponível em: < <http://nic.sav.sk/logos/books/scientific/z.html>>. Acesso em 18 de junho de 2003.

1.5 ENZIMAS CELULARES ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO

1.5.1 MIELOPEROXIDASE

A mieloperoxidase é uma enzima liberada de neutrófilos ativados e corresponde a 5% do peso seco destas células. Em conjunto com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cofatores hálides oxidáveis (halo) e pH ácido, produz ácido hipocloroso (HOCl). De forma geral, a ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) gera inúmeros radicais livres, dentre eles destacam-se: ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxilas (OH^\cdot), ácido hipocloroso (HOCl) (PIZZO, 1997). Este último tem forte poder oxidante e rapidamente interage com outras moléculas, como, por exemplo, aminas, tióis, tioésteres e nucleotídeos. Daí, resulta a formação de um sistema antimicrobiano potente desenvolvido no fagolisossoma que tem capacidades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antimicoplasmal (EISERICH et al, 1998).

Estudos têm demonstrado o envolvimento desta enzima, bem como a formação de anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) (SEDIVA et al, 1998; REYNOLDS et al., 2002) em diversas patologias: nas leucemias mielóides (KONIKOVA et al., 1998), na glomerulonefrite (TAKEDA et al., 1998), na doença de Alzheimer (COMBARROS, et al., 2002), entre outras. A ausência da mieloperoxidase retarda a atividade microbicida dos neutrófilos após a fagocitose dos microorganismos. Na deficiência desta enzima, a atividade da peroxidase está ausente nos neutrófilos e nos monócitos, porém, presente nos eosinófilos (BOXER, 1997; PIZZO, 1997). Todavia acaba ocorrendo destruição eficaz das bactérias, pois os neutrófilos com deficiência de mieloperoxidase acumulam mais peróxido de hidrogênio do que os neutrófilos normais, melhorando a atividade bactericida dos neutrófilos envolvidos (BOXER, 1997). A deficiência de mieloperoxidase, um distúrbio autossômico recessivo, constitui o distúrbio hereditário mais

comum da função dos neutrófilos, com uma estimativa de frequência variando de 1 em cada 2000 a 1 em cada 4000 (BOXER, 1997). Do ponto de vista clínico, o problema mais freqüente consiste em aumento das infecções por *Candida sp* em alguns pacientes com diabetes mellitus concomitante (BOXER, 1997).

1.5.2 ADENOSINA-DEAMINASE

O processo inflamatório é crucial para a destruição de patógenos e de células infectadas por vírus pelo sistema imune celular, que secreta uma variedade de citocinas e substâncias pro-inflamatórias (HOLLER, 2002). Por outro lado, a ativação de substâncias pro-inflamatórias também resulta em efeitos indesejados para o organismo, principalmente causando lesão tecidual. Dentre estes mediadores, podemos destacar a adenosina-deaminase (ADA), a qual em grandes quantidades pode diminuir consideravelmente os níveis de adenosina, um poderoso autacóide antiinflamatório (MABLEY et al., 2003).

A ADA é uma enzima presente no metabolismo das purinas. Ela cataliza irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina à desoxinosina e inosina, respectivamente, e possui um papel importante na maturação e atividade de monócitos e linfócitos (KAYACAN et al., 2002). A ADA também regula os níveis plasmáticos de adenosina, a qual está associada diretamente com a resposta inflamatória e a produção de citocinas (ZIDEK, 1999). Diversos estudos têm demonstrado que a ADA é uma enzima liberada principalmente por linfócitos ativados (BLACKBURN et al., 1998; GROOTEMAN et al., 2000). Além disso, a atividade desta enzima ocorre por meio da ação das isoenzimas denominadas ADA-1 e ADA-2. O aumento da atividade da ADA tem sido encontrada no soro de pacientes com tuberculose,

leishmaniose cutânea, lepra, brucelose, salmonelose, imunossuprimidos, submetidos a transplantes renais, rejeição de enxertos, entre outros (BLACKBURN et al., 1998; COLLAZOS et al., 1998; EREL et al., 1998). Estes estudos demonstram que a ADA é um importante marcador da severidade da resposta inflamatória (LLUIS et al., 1998). Porém, seus níveis aumentados têm sido considerado um marcador inespecífico da imunidade mediada por células (LIU et al., 2000; BLACKBURN, 2003).

1.6 MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO

1.6.1 EICOSANÓIDES

Os eicosanóides são metabólitos ativos biologicamente, derivados do ácido araquidônico (AA), e que participam diretamente das reações inflamatórias. São formados a partir dos fosfolipídeos de membrana, em resposta a uma variedade de estímulos físicos, químicos, hormonal, citocinas, entre outros. O ácido araquidônico é mobilizado dos fosfolipídeos de membrana que através da ação das fosfolipases, degradam os fosfolipídeos transformando-os em ácido araquidônico. Posteriormente, o AA ainda pode sofrer a ação de duas classes de enzimas completamente diferentes, as ciclooxigenases (COX1 ou COX-2) e a 5-lipooxigenase, cada uma promovendo a formação de mediadores da inflamação (Figura 5).

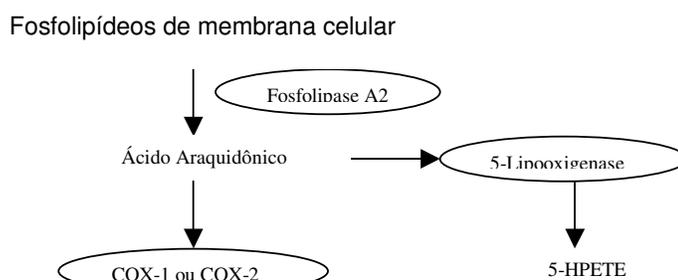


Figura 5 – Metabolismo do Ácido araquidônico, e liberação dos eicosanóides. COX-1 = ciclooxigenase 1; COX-2 = ciclooxigenase 2; 5-HPETE = ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenóico; PGI₂ = prostaciclina I₂; TXA₂ = tromboxano; PGF_{2α} = prostaglandina F2 alfa; PGE₂ = prostaglandina E₂; PGD₂ = prostaglandina D₂. Adaptado de EVANS et al., 2003.

Quando o ácido araquidônico sofre ação das ciclooxigenases, há a formação dos chamados prostanóides, dentre os quais podemos destacar: TXA₂, PGH₂, PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, PGI₂ (FITZGERALD et al, 2001; SUBONGKOT et al, 2003). O ácido araquidônico ainda pode ser convertido a outros mediadores da reação inflamatória, chamados de leucotrienos, pela ação da enzima 5-lipooxigenase (PARENTE e PERRETTI, 2003).

Os eicosanóides são importantes mediadores da inflamação, entretanto participam diretamente de processos fisiológicos, como a homeostase, contração uterina no trabalho de parto, além da função renal (FUNK, 2001; SUBONGKOT et al, 2003). Na tabela 2, estão mencionados os principais efeitos dos eicosanóides no organismo humano.

Tabela 2 - Resumo das principais funções fisiológicas e inflamatórias dos mediadores eicosanóides.

SUBSTÂNCIAS DERIVADAS DA AÇÃO DAS ENZIMAS CICLOOXIGENASES (COX-1 e COX-2)	
TXA₂	Vasoconstrição e ativação da agregação plaquetária
PGI₂	Vasodilatação, inibição da agregação plaquetária
PGF_{2α}	Vasoconstrição, ovulação
PGE₂	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, febre, dor, função renal
PGD₂	Vasoconstrição, reações alérgicas, regulação do sono
SUBSTÂNCIAS DERIVADAS DA AÇÃO DA ENZIMA 5-LIPOOXIGENASE	
LTA₄	Precursor de leucotrienos com ação fisiológica
LTB₄	Quimiotaxia, vasoconstrição
LTC₄	Broncoespasmo, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular
LTD₄	Broncoespasmo, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular
LTE₄	Broncoespasmo, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular

PGI₂ = prostaciclina I₂; TXA₂ = tromboxano; PGF_{2α} = prostaglandina F2 alfa; PGE₂ = prostaglandina E₂; PGD₂ = prostaglandina D₂; LTA₄ = leucotrieno A₄; LTB₄ = leucotrieno B₄; LTC₄ = leucotrieno C₄; LTD₄ = leucotrieno D₄; LTE₄ = leucotrieno E₄. Adaptado de Evans et al., 2003.

1.6.2 ÓXIDO NÍTRICO

A vasodilatação que ocorre nas fases iniciais do processo inflamatório, induzida por diferentes agentes, incluindo bradicinina, histamina, substância P, serotonina e trombina, é dependente da liberação do fator relaxante derivado do endotélio, o NO (HOLZER, 1998). O NO endógeno possui um papel importante na regulação de diversas atividades fisiológicas, incluindo o relaxamento vascular, a inibição da agregação plaquetária, a neurotransmissão,

as atividades anti-microbiana e anti-tumoral dos macrófagos, entre outras (DJUPESLAND et al., 2001).

O NO é um gás derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). O NO gerado difunde-se pelas células e ativa a guanilato ciclase solúvel, resultando na formação do monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina (GMPc). Na musculatura lisa, o GMPc causa relaxamento (BALTRONS et al., 2003). Outros efeitos deletérios do NO, entretanto, são decorrentes da ação citotóxica de alguns de seus metabólitos, como, por exemplo, o peroxinitrito e os nitrosotióis (CUZZOCREA et al., 2000; SZABÓ, 2003).

São descritas 3 isoformas da NOS (ALDERTON et al., 2001; CIRINO et al., 2003), das quais 2 são constitutivas (NOc) e estão localizadas no tecido nervoso central (óxido nítrico sintase neuronal: NOSn ou NOS I), e a outra, nas células endoteliais (óxido nítrico sintase endotelial: NOSe ou NOS III) (AUBRY et al., 1997; CIRINO et al., 2003). Já, a óxido nítrico sintase induzida (NOSi ou NOS II) não é, em geral, expressa em condições fisiológicas. Diversos agentes, como citocinas inflamatórias, oxidantes e endotoxinas de bactérias Gram-negativas, induzem a sua expressão em diferentes tipos celulares como os macrófagos (MUHL e DINARELLO, 1997), os neutrófilos (EISERICH et al., 1998), os mononucleares (ROUZAUT et al., 1999), os eosinófilos (FERREIRA et al., 2002) e as células da musculatura lisa vascular (CHA et al., 2001). Essa enzima é pouco dependente de cálcio (Ca^{+2}). A expressão da NOSi resulta na geração de quantidades muito maiores de NO, em comparação com aquelas produzidas pela NOc.

A NOSi está envolvida na fisiopatologia das doenças inflamatórias, como a sepsis (AVONTUUR et al., 1998), a artrite reumatóide (CLAIR, 1998;

JANG e MURRELL, 1998), a glomerulonefrite (RHODEN, et al., 2002), o diabetes (MATSUNAGA et al., 2002), a rejeição de enxertos (WILDHIRT et al., 2001), as doenças neurológicas (ARIMOTO e BING, 2003), as doenças das vias aéreas (BARNES et al., 1998) e na defesa contra infecção, entre outras.

Entre as doenças em que a participação do NO tem sido muito estudada incluem-se: a asma brônquica e o choque séptico (BERNAREGGI et al., 1997). Estudos imuno-histológicos identificaram a presença das 3 isoformas da NOS, nas vias aéreas de humanos (GIAID et al., 1998). A NOS_e está localizada nas células endoteliais da circulação pulmonar e no epitélio. A NOS_n foi caracterizada tanto nos nervos colinérgicos como em células epiteliais das vias aéreas (GREENBERG et al., 1998). Além disso, estudos em tecidos de pacientes asmáticos, utilizando técnicas imuno-histoquímicas identificaram a NOS_i nas células epiteliais, nos macrófagos e nos eosinófilos das vias aéreas (GIAID et al., 1998). Tais resultados foram validados em cultura de células epiteliais das vias aéreas humanas. Nas mesmas condições experimentais, citocinas pró-inflamatórias aumentam a liberação de NO, bem como a imunorreatividade para a NOS_i e o nível do RNAm para NOS_i (LEE et al., 2003).

Outros estudos tem demonstrado que a expressão da NOS_i está associada também à ativação prévia do receptor do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (NF-κB), envolvido na transcrição de muitos genes das respostas imunes e inflamatórias (BARNES e KARIN, 1997). A ativação do receptor NF-κB constitui uma etapa essencial para a transcrição do gene da NOS_i e pode ser ativado por citocinas pró-inflamatórias (KIM et al., 2002).

1.6.3 CITOCINAS

As citocinas são um grupo de proteínas solúveis, ou proteínas de membrana celular, ou glicoproteínas mensageiras, que transportam informações de uma célula para outra. Mais de 200 citocinas já foram identificadas, e estas estão classificadas em subgrupos, como por exemplo: interleucinas, fatores de crescimento, quemocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia. Tradicionalmente também são divididas, conforme sua atividade inflamatória, em: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β) e antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-10, IL-4) (WONG et al., 2003).

A função das citocinas é especificamente celular, por sua ação em receptores localizados na superfície da célula alvo. Como mediadores solúveis, sua função pode ser autócrina, parácrina ou sistêmica. Algumas citocinas possuem receptores solúveis, que são ativados agonisticamente quando ligados a tais citocinas (HULKKONEN et al., 2002).

As citocinas são responsáveis por algumas ações pró-inflamatórias, inibindo outras citocinas antiinflamatórias, ou atuando diretamente como antagonistas de receptores antiinflamatórios. O balanço entre os fatores excitatórios e os inibitórios é essencial para a função celular normal, e torna-se evidente que o desequilíbrio na produção de citocinas é observado em grande número de patologias (CALLARD et al., 1999).

1.7 FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR

Os fatores de transcrição nuclear regulam a expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas, enzimas, mediadores relacionados à inflamação, entre outros. Estes fatores são ativados por

vários estímulos, coordenando a resposta inflamatória e possuindo papel fundamental na resposta contra agentes estranhos e doenças inflamatórias crônicas, como a asma brônquica e a artrite reumatóide (WANG et al., 2002).

O fator de transcrição nuclear (NF- κ B), foi o primeiro fator de transcrição identificado. Primeiramente, sua função fisiológica foi descrita como regulador da expressão da cadeia leve das imunoglobulinas (cadeia kappa) em linfócitos B de camundongos. Nos mamíferos já foram identificadas 5 proteínas diferentes que podem combinar-se entre si, para formar o NF- κ B: p50, Rel A (p65), c-Rel, p52 e a Rel B (WANG et al., 2002).

O fator de transcrição é um homodímero ou um heterodímero, presente no citoplasma de células eucarióticas, fisiologicamente se encontra inativo e ligado a uma proteína inibitória denominada de (I κ B), a qual nos mamíferos apresenta-se dividida também em famílias: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , I κ B- γ , Bcl-3, p105 e p100. A partir de um estímulo, o heterodímero (p50, p65) se desliga liberando o NF- κ B, que se desloca até o núcleo, onde interage com elementos regulatórios do DNA, iniciando desta forma a síntese de proteínas e a liberação de mediadores anti- ou pró-inflamatórios, na tentativa de combater o agente estranho (MAJUMDAR e AGGARWAL, 2001).

1.8 IMUNOSUPRESSORES

1.8.1 METOTREXATO

O metotrexato foi sintetizado acerca de 50 anos, com o objetivo de se obter um fármaco antagonista competitivo do ácido fólico (SCHNABEL, 2001).

O uso inicial deste fármaco foi no tratamento de tumores e principalmente na leucemia. Subseqüentemente, o metotrexato foi utilizado no tratamento de doenças não neoplásicas como antiinflamatório e imunossupressor (SEITZ, 1999).

Atualmente o metotrexato é utilizado no tratamento da artrite reumatóide (WEINBLATT et al, 1998), da psoríase, da cirrose biliar primária, da doença de Crohn e da asma intrínseca (GENESTIER et al., 2000).

O mecanismo pelo qual o metotrexato exerce seus efeitos em nível celular, ainda permanece pouco esclarecido. O metotrexato é capturado pelas células e tecidos e é convertido imediatamente a metabólitos complexados ao glutamato (metotrexato poliglutamatos) e são estes derivados que detêm as atividades bioquímicas e biológicas do fármaco (PANETTA et al., 2002). Os MTX-poliglutamatos inibem a enzima dihidrofolato-redutase (DHFR) e outras enzimas dependentes de folato, agindo sobre a biossíntese dos nucleotídeos (purinas e pirimidinas) (BUDZIK et al., 2000).

No câncer, as células tumorais necessitam de grande quantidade de nucleotídeos, componentes vitais para a formação do ácido ribonuclêico (RNA) e ácido desoxiribonuclêico (DNA), o que nas células normais é muito menor, devido a sua baixa capacidade de multiplicação e crescimento, em comparação às células tumorais (PIVOT et al., 2003). Muitos estudos tem tentado explicar os efeitos antiinflamatórios do metotrexato , dentre eles, destacam-se: a apoptose e a deleção clonal das células T ativadas (GENESTIER et al., 1998), a supressão na biossíntese das purinas em células T estimuladas (FAIRBANKS et al., 1999), a inibição de citocinas inflamatórias (CONSTANTIN et al., 1998; SEITZ e DAYER, 2000; SUNG et al., 2000), a liberação de adenosina (MORABITO et al., 1998; MONTESINOS et al., 2002),

a modulação na liberação de metaloproteinases, e a inibição na expressão de moléculas de adesão (KRAAN et al., 2000).

1.8.2 CICLOSPORINA A

A ciclosporina A, apresenta-se como um polipeptídeo composto de onze aminoácidos. Este fármaco é produzido por duas espécies de fungos, *Cylindrocarpon lucidum* e *Tolyposcladium inflatum*. O composto foi primeiramente isolado em 1970 por J. Borel, e este autor demonstrou que este fármaco possui importante ação imunossupressora em modelos de leucemia murina (BOREL, 1982). Atualmente a ciclosporina A, é muito utilizada na rejeição de enxertos, principalmente no transplante de órgãos sólidos (FUJISAKI et al., 2002).

A ciclosporina A é um fármaco imunossupressor que bloqueia a proliferação de linfócitos T (TRUFFA-BACHI et al., 2000). Este fármaco liga-se com afinidade a uma família de proteínas citoplasmáticas denominadas de imunofilinas, e exerce seu efeito imunossupressor através da inibição na expressão gênica da interleucina-2 (IL-2) (ALTAVILLA et al., 2001). Além disso, outros efeitos imunossupressores da ciclosporina A tem sido postulados, via ligação com a aminofilina. O complexo fármaco-aminofilina, inibe a calcineurina fosfatase (HANSSON et al, 2003) e com isso este fármaco bloqueia os eventos dependentes de cálcio, como a expressão de genes responsáveis pela produção de citocinas, ativação da óxido nítrico sintase (NOs), desgranulação celular e apoptose (PYRZYNSKA et al., 2001), entre outros.

Outros estudos demonstram que a ciclosporina A previne a ativação do NF- κ B, pela inibição da ação da calcineurina, a qual indiretamente induz a

degradação do I κ B, proteína inibitória do NF- κ B (MAYER et al., 1997). Estudos também demonstram que a ciclosporina A, possui efeitos antiinflamatórios quando utilizada em doenças autoimunes e crônicas, como a artrite reumatóide (LAVAGNO et al., 2001), a asma brônquica (SIHRA et al., 1997), a doença de Crohn (PORGES et al., 1998) e a psoríase (MARCIL e STERN, 2001).

1.9 MODELO EXPERIMENTAL INFLAMATÓRIO

1.9.1 PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

Diversos modelos de inflamação, utilizando animais de diferentes espécies, têm sido utilizados para avaliar as drogas usadas no tratamento de doenças inflamatórias. Isto se deve ao fato que apesar da maioria das reações inflamatórias apresentar características comuns, sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de modelos específicos que reproduzam as suas características básicas. Desta forma é fácil compreender também porque o tratamento de doenças inflamatórias é bastante diversificado.

Esforços têm sido realizados no sentido de se identificar modelos experimentais apropriados para cada tipo de reação inflamatória como asma brônquica, artrite reumatóide e retocolite ulcerativa, entre outros. Protocolos experimentais onde o processo inflamatório é induzido agudamente têm sido utilizados para estudos desta reação abordando, entre outros, a participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares, além de possibilitar o *screening* de drogas com potencial antiinflamatório. Entre eles cita-se: pleurisia, indução de edema de pata, bolsa de ar no dorso, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK e

WILLOUGHBY, 1989). No entanto, a limitação destas técnicas se deve tanto à dificuldade de manipulação durante a indução inflamatória quanto a da quantificação dos parâmetros envolvidos (edema, número de células acumuladas no sítio inflamatório, extravasamento de proteínas, etc). Entre as espécies animais, o rato, o camundongo e mais recentemente o coelho, têm sido utilizados para estudos farmacológicos do processo inflamatório. No entanto, uma análise bioquímica mais detalhada acerca dos mediadores envolvidos também é limitada pois, por exemplo, a grande maioria dos anticorpos disponíveis para fenotipagem de células, quantificação das citocinas e moléculas de adesão envolvidas foram desenvolvidas em camundongos.

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (YAMAMOTO et al., 1975; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989). Com o desenvolvimento deste modelo foi possível então fazer uma avaliação não só do extravasamento de líquido como da migração de células induzidos por diversos agentes flogísticos (DE BRITO, 1989; SALEH et al., 1996; 1997; 1999). A técnica de pleurisia possui vantagens em relação a do edema de pata, pois a partir da coleta do lavado na cavidade pleural é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional da pleurisia é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. Além disso, uma grande variedade de substâncias têm sido testadas para avaliar possível atividade inflamatória nas vias aéreas de animais (LUZ et al., 1993).

Conforme a figura 6, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, ocorre uma resposta inflamatória bifásica.

Caracterizada por uma primeira fase, também denominada de fase recente, que ocorre 4 h após a administração da carragenina na cavidade pleural destes animais. Nesta fase evidencia-se um aumento na exsudação, bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares. A segunda fase ou fase tardia ocorre 48 h após, e é caracterizada pelo aumento da exsudação e de leucócitos do tipo mononucleares (SALEH et al., 1996; FRÖDE et al., 1999; DALMARCO et al., 2002).

De um modo geral, a inflamação produzida na cavidade pleural é lenta e prolongada em comparação com aquela desenvolvida na pele. Isto se deve ao fato de haver diferenças na resposta ao mediador inflamatório, na drenagem linfática bem como nos tipos celulares envolvidos. Por exemplo: 5-hidroxitriptamina, BK e PGE₁ e PGE₂, quando administradas isoladamente ou em combinação na cavidade pleural produzem pouca exsudação. Ao contrário, na pele, estes mediadores induzem rapidamente a formação de edema (VINEGAR et al., 1976). Além disso, a cavidade pleural ocupa uma superfície relativamente grande. Admite-se que o sítio primário da inflamação na cavidade pleural seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório, induzido experimentalmente na cavidade, pode ocorrer acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudato. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório. Além disso, o tipo, a intensidade e a duração da inflamação produzida pela injeção de um agente flogístico dependerá da sua persistência na cavidade pleural e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares.

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima sobre a sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória e teste de drogas com potenciais antiinflamatórios. Como citado, o volume de fluido extravasado, o acúmulo de células e os mediadores químicos que participam da reação podem ser quantitativa e qualitativamente analisados.

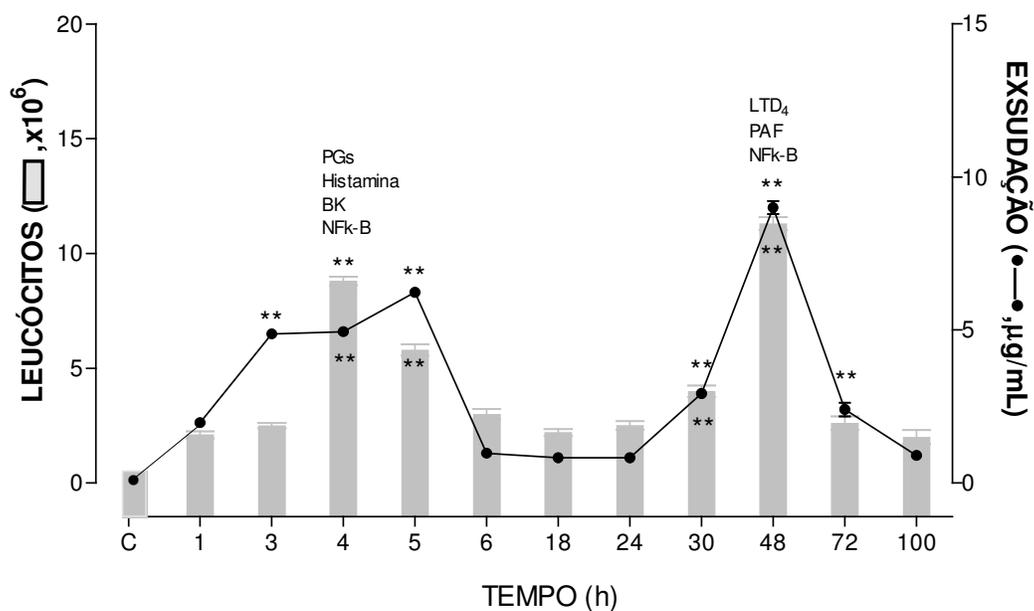


Figura 6 – Esquema demonstrando o perfil bifásico do modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Retirado de SALEH et al., 1996.

2. JUSTIFICATIVA

A asma brônquica é uma doença inflamatória das vias aéreas, que determina uma obstrução significativa do fluxo aéreo. Estima-se nos países do primeiro mundo que a incidência desta doença tem aumentado nos últimos anos. Além disso, tem-se observado aumento crescente da prevalência e severidade desta doença, o que é comprovado pelos altos índices de mortalidade. Nos Estados Unidos, é a principal causa de internação infantil (CHULADA et al., 2003) Estes dados têm preocupado as autoridades de saúde em diversos países e parece estar ocorrendo a despeito do aumento da prescrição de medicamentos para o seu tratamento, sugerindo que a terapia disponível não é ainda a mais adequada.

Na asma brônquica ocorre resposta inflamatória exacerbada expressa por tosse, sibilos, rigidez torácica e dificuldade respiratória, geralmente de caráter reversível, podendo apresentar diferentes graus de severidade e algumas vezes ser fatal. Além disso, ocorre o envolvimento de vários tipos celulares, incluindo mastócitos e eosinófilos que quando ativados, promovem aumento da reatividade das vias aéreas. Este processo inflamatório ocorre mesmo nos casos considerados leves da doença. No entanto, apesar de todos os progressos, a asma ainda hoje é uma doença de evolução problemática e que pode levar mesmo à morte. O reconhecimento formal do processo inflamatório como peça chave na fisiopatogenia desta doença reforçou nos últimos anos o uso de antiinflamatórios como forma mais adequada de terapia dos casos classificados como moderados e severos. Paralelamente, a indústria farmacêutica foi estimulada a procurar novos medicamentos para o tratamento desta doença.

Esforços têm sido feitos na tentativa de melhor estudar a asma brônquica, tendo em vista que não existem modelos adequados que

reproduzam esta doença em animais de laboratório. Do ponto de vista experimental, a manifestação destas diferentes fases do processo inflamatório pode ser estudada em animais de laboratório através da medida da resistência das vias aéreas ou do influxo de células inflamatórias para a luz brônquica pela técnica do lavado brônquico após exposição inalatória ou da pleurisia induzida por diferentes compostos ou antígenos.

Com base nos conhecimentos acima, recentes trabalhos têm trazido novos conceitos a respeito do desencadeamento do processo inflamatório nas vias aéreas. Acredita-se que, certamente, a participação de citocinas, infecções virais e diversos mediadores inflamatórios tem um papel importante na modulação da inflamação aguda e crônica desta doença (WONG et al., 2003). Em decorrência destes estudos, tem sido demonstrado que a obstrução persistente das vias aéreas está intimamente associada à manutenção da inflamação (BARNES et al., 1998), o que resultou em mudanças drásticas na terapia desta doença nos últimos tempos.

Por muitos anos, o tratamento da asma tem dependido dos glicocorticóides, introduzidos na clínica nos anos 40, e provavelmente eficazes em controlar a asma na maioria dos pacientes tratados. Porém, o uso contínuo e prolongado deste fármaco promove muitos efeitos indesejados, por isso a busca contínua de novos fármacos para o tratamento desta patologia. Um tratamento alternativo, tem sido a utilização de imunossuppressores disponíveis na clínica, como o metotrexato e a ciclosporina A. Estudos tem demonstrado que a utilização do metotrexato e da ciclosporina A, com este objetivo tem trazido benefícios consideráveis aos pacientes asmáticos, em relação aos efeitos colaterais observados (FREW e PLUMMERIDGE, 2001).

Desta forma, o melhor entendimento do mecanismo de ação antiinflamatório de fármacos imunossupressores, contribuirá para o tratamento eficaz das doenças das vias aéreas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito de fármacos imunossupressores (Metotrexato e Ciclosporina A) no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

3.2. Específicos:

1. Avaliar o efeito antiinflamatório de fármacos imunossupressores (Metotrexato, Ciclosporina A) administradas por via intraperitoneal (i.p.) sobre a cinética dos leucócitos (Polimorfonucleares, Monócitos e Macrófagos) no lavado da cavidade pleural e no sangue de animais tratados com carragenina;
2. Investigar o efeito destes fármacos, sobre as concentrações de mieloperoxidase, adenosina-deaminase e dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), obtidos no lavado da cavidade pleural;
3. Avaliar o efeito dos fármacos imunossupressores mencionados acima sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, fígado, coração, baço e rim);

4. Avaliar o efeito dos fármacos imunossupressores estudados, sobre a organização celular e a migração de leucócitos para os tecidos (pulmão, fígado, coração, baço e rins);

5. Avaliar o efeito das drogas estudadas sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a/CD18 no pulmão e no baço.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos Suiços, 2 meses de idade de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro controlado de 12 h, em gaiolas de plástico, com livre acesso à água e ração.

4.2 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

A anestesia foi induzida com éter etílico administrado por via inalatória, a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, i.v., intraorbital) com o objetivo de avaliarmos posteriormente a exsudação.

4.3 MODELO DE INFLAMAÇÃO UTILIZADO

- ***Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos***

Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos previamente (HENRIQUES et al, 1993; FRÖDE e MEDEIROS, 2001; FRÖDE et al., 2002).

Sabe-se que neste modelo experimental ocorre aumento de leucócitos, às custas de polimorfonucleares 4 h e de mononucleares 48 h após a administração de carragenina, na cavidade pleural de camundongos. Assim foi avaliado o efeito de fármacos imunossupressoras sobre os leucócitos nestas duas fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina.

No dia da indução da pleurisia, os animais foram anestesiados com éter etílico e 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico (Cg, 1%), foi administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal.

De acordo com cada protocolo experimental, após a administração do agente flogístico ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo com overdose de éter etílico. A seguir, foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, os pulmões e ambas as cavidades pleurais foram expostos. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de solução salina tamponada (PBS-pH 7,6) e heparinizada (20 UI/mL). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipetas automáticas para a quantificação dos números total e diferencial de células.

De acordo com o protocolo experimental, uma hora antes dos experimentos, grupos de animais foram tratados com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (FRÖDE e MEDEIROS, 2001; FRÖDE et al., 2002). Utilizando o mesmo protocolo experimental, as possíveis variações sobre os índices de permeabilidade vascular, no pulmão, no coração, no baço, no fígado e nos rins foram também estudados.

4.4 TÉCNICAS UTILIZADAS

4.4.1 Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade pleural e no sangue total

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 μ L) foram reservadas para a contagem celular total, em contador de células automático (Beckman-Coulter, Brea, Califórnia, E.U.A.), e para a realização de esfregaços celulares. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.), estes foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Em alguns experimentos, os animais foram previamente anestesiados com éter etílico e as amostras de sangue total foram coletadas através da punção cardíaca em tubo contendo anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético: E.D.T.A.). Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

- ***Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se o May-Grünwald-Giemsa***

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grüwald) e de azul-eosina (Giemsa).

As lâminas contendo o sedimento do lavado pleural foram centrifugadas utilizando-se citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.) e colocadas em posição horizontal, em suporte de coloração apropriado. Após a secagem destas lâminas, 1 mL do corante May-Grünwald foi adicionado e deixado em contato durante 3 min. A seguir adicionou-se água destilada (± 20 gotas) para cada lâmina, com auxílio de pipeta com capacidade de 1 mL. Após 1 min de incubação, o corante foi retirado e adicionou-se 1 mL de Giemsa (diluído 1:20,

em água destilada), durante 15 min. A seguir, o corante foi escorrido e as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de polimorfonucleares ou de mononucleares ($\times 10^6$).

4.4.2 Contagem de macrófagos obtidos no lavado da cavidade pleural

Neste experimento 48 horas após a administração da carragenina, os animais foram sacrificados com overdose de éter etílico e uma alíquota (100 μ L) do lavado pleural, foi reservada para a quantificação dos macrófagos. Para este fim foram realizados esfregaços celulares, utilizando-se citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.), e estes foram corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina. Os resultados foram expressos em número total de macrófagos ($\times 10^6$).

• *Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se a Hematoxilina-Eosina*

Os lavados pleurais identificados, foram centrifugados em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.). Após secagem das lâminas em estufa (50° C), estas foram coradas por imersão, em cuba de vidro contendo 200 mL de hematoxilina (0,4%) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 3 min e posterior lavagem em água corrente (10 min). A seguir utilizou-se 200 mL de solução água amoniacal (1 mMol) (Merck, Darmstadt, Alemanha), também contida em cuba de vidro, onde as lâminas foram mergulhadas por 15 segundos. Logo a seguir, novo banho em água corrente por 10 min foi realizado, seguido da imersão das lâminas em 200 mL de eosina amarelada (0,35%) por 2 min (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil). Posteriormente, novo banho em álcool

absoluto (10 banhos) seguidos da imersão em 200 mL de xilol P.A., foi realizado também em cuba de vidro. Por fim, as lâminas foram fixadas em entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Imínula para análise em microscópio ótico comum (aumento de 200 x), contando-se 100 células por lâmina.

4.4.3 Determinação do exsudato na cavidade pleural

Nos animais submetidos à pleurisia induzida pela carragenina, após a lavagem das cavidades pleurais com solução PBS, uma alíquota (500 µL) foi separada e congelada em freezer (-20⁰C) para posterior determinação dos níveis de azul de Evans. No dia dos experimentos, amostras de um mesmo protocolo experimental foram descongeladas à temperatura ambiente e as concentrações do corante foram determinadas em leitor de Elisa (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,1-50 µg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, com auxílio da equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans, no lavado pleural foram expressos em µg/mL.

4.4.4 Determinação da permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins)

Para avaliar a permeabilidade vascular em diferentes órgãos, inicialmente foram determinados os seus respectivos pesos (pulmão, coração,

baço, fígado e rim) em gramas. Após repetidas lavagens, em solução PBS e remoção dos tecidos adjacentes, os tecidos foram cortados em fatias e transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de formamida P.A. As amostras foram incubadas em banho-maria (45⁰C) durante 72 h para posterior quantificação dos níveis de azul de Evans. Decorrido o período de incubação, os tubos de ensaio foram centrifugados (10 min, 50 x g) e os sobrenadantes foram transferidos para cubetas para medida das concentrações do azul de Evans, que foi realizada segundo a metodologia descrita no modelo da pleurisia (FRÖDE e MEDEIROS, 2001; FRÖDE et al., 2002). Os valores das concentrações de azul de Evans em tecidos foram expressos em µg/g de tecido úmido.

4.4.5 Determinação da mieloperoxidase no lavado pleural

Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. Imediatamente após o sacrifício dos animais, e fixação em mesa cirúrgica, amostras do lavado pleural de camundongos injetados com solução salina 0,9%, tratados com carragenina (1%), metotrexato (20 mg/kg, i.p e 40 mg/kg, i.p.) ou ciclosporina A (1 mg/kg, i.p. e 2 mg/kg, i.p.), foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação das concentrações de mieloperoxidase. Volumes de 40 µL do lavado ou do padrão (mieloperoxidase de neutrófilos humanos ((Sigma M-6908): 0,7-140 mU/mL) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360 µL de meio tampão (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂ (RAO et al., 1993). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com

a adição de 30 μL de azida sódica (1%). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50 x g, 5 min) e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em leitor de Elisa (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

4.4.6 Determinação da adenosina-deaminase no lavado pleural

Inicialmente amostras com concentrações conhecidas (volume final 2500 μL) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas com a finalidade de obtermos curva padrão com concentrações conhecidas (10 a 50 U/L). Amostras do fluido pleural (20 μL) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6.5, 500 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000 μL) de fenol (1 mM), nitroprussiato (0,17 mM) e tampão fosfato (1000 μL : NaOCl: 11 mM). Esta solução também foi adicionada as cubetas contendo concentrações diferentes das amostras padrão (volume final 2500 μL). As absorvâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de elisa (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.). A quantificação dos valores desconhecidos foram expressos em U/L, com auxílio da equação da reta.

4.4.7 Análise quantitativa do nitrito/nitrato (NOx) no lavado pleural

O óxido nítrico foi quantificado pela formação de seus metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. As amostras do lavado da cavidade pleural de camundongos tratados com solução salina, carragenina, metotrexate ou ciclosporina A, foram coletadas, armazenadas em frascos Eppendorf e estocadas em freezer a -20°C . No dia dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e foram desproteinizadas adicionando-lhes hidróxido de sódio (2,5 N) e sulfato de zinco (0,6%). A seguir, 300 μL do lavado da cavidade pleural foi diluído em uma solução contendo formato de amônio (30 μL), fosfato de sódio (30 μL) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922 (30 μL): diluída (1:10) em tampão PBS (pH 7,2). A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C , e a seguir, centrifugada (50 x g, 5 min). Cerca de 250 μL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde o mesmo volume de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (peso/vol), ácido fosfórico (5%) (vol/vol) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (peso/vol) foi adicionado e incubado durante 10 min, à temperatura ambiente.

A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em leitor de elisa (Organon -Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0-100 μM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a

quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato, em μM , com auxílio da equação da reta.

4.4.8 Análise histológica dos órgãos (pulmão, baço, rins, fígado e coração)

Após o tratamento dos animais com os fármacos imunossupressores, e indução da pleurisia, os camundongos foram sacrificados com *overdose* de éter etílico. Em seguida, os animais foram fixados em mesa cirúrgica e a cavidade torácica e abdominal foram abertas e os órgãos: pulmão, baço, rins, fígado e coração foram fixados e incubados em 2 mL de solução formalina (10 %), em frascos escuros, até o início do processamento histológico (48 h).

Após 48 h, os segmentos teciduais foram colocados em cápsulas de plástico, e estas, inseridas em cesta de metal do aparelho histotécnico. No aparelho, os segmentos teciduais foram sucessivamente desidratados em etanol (70°. G.L., 80°. G.L. e 95°. G.L. e absoluto, respectivamente), durante 1 h em cada etapa. Em seguida, foram incubadas consecutivamente em solução de xilol P.A. e posteriormente solidificação em parafina. As cápsulas contendo os segmentos desidratados e parafinados, foram então retiradas do aparelho histotécnico e cada fragmento foi envolto num quadrado metálico (*Leockart*) e imediatamente embebido novamente em parafina líquida. Os quadrados foram posteriormente armazenados em geladeira para a completa solidificação. Os fragmentos teciduais foram cortados à espessura de 3 micras, com auxílio do micrótomo (LEICA-Instruments, Nussloch, Alemanha). Posteriormente, procedeu-se a desparafinação em banho-maria, e o material foi então transferido para uma lâmina de vidro. A seguir, estas lâminas foram secas em estufa à 50°C, durante 24 h e armazenadas à temperatura ambiente, para

posterior coloração pela hematoxilina-eosina. Os parâmetros histopatológicos avaliados foram: organização tecidual, infiltração celular e necrose tecidual. As quantificações dos parâmetros histopatológicos foram analisadas atribuindo-se graus de 0 a 3, sendo 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado e 3 = abundante, utilizando-se uma adaptação do índice morfológico semiquantitativo das escalas propostas por MOTOHIRO et al., (1986) e LOSSOS et al., (2000). A avaliação histopatológica foi realizada por estudo duplo-cego.

- ***Coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-Eosina***

Após secagem das lâminas em estufa (50° C), procedeu-se à coloração, por hematoxilina (0,4%) (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cuba de vidro, por 3 min, seguida da lavagem em água corrente (10 min). Na próxima etapa, adicionou-se solução de água amoniacal (1 mMol) (Merck, Darmstadt, Alemanha), na cuba de vidro e logo a seguir, novo banho em água corrente por 10 min. Posteriormente, as lâminas foram imersas em eosina amarelada (0,35%) por 2 min (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), seguida de novo banho em álcool absoluto (10 banhos). Após esta etapa as lâminas foram imersas em xilol P.A., mantido em cuba de vidro. Por fim, foi realizada a fixação das lâminas com entellan e lâminula, para posterior quantificação da celularidade em microscópio ótico comum (aumento de 200 x), contando-se 100 células. Os resultados foram expressos de acordo com parâmetros histológicos propostos por MOTOHIRO et al., (1986) e LOSSOS et al., (2000).

4.4.9 Determinação dos antígenos leucocitários (CD11a, CD18) por imunohistoquímica no pulmão e no baço

Para análise dos antígenos leucocitários, as amostras teciduais dos pulmões e do baço foram seccionadas em cortes de aproximadamente três micras de espessura utilizando-se micrótomo (LEICA-Instruments, Nussloch, Alemanha). Estas amostras foram fixadas em lâminas silanizadas (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.). Estas lâminas foram desparafinadas previamente em estufa à 50°C, durante 24 h e armazenadas à temperatura ambiente (24 h) para a análise imuno-histoquímica. Inicialmente as amostras foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio (MERCK, São Paulo, São Paulo, Brasil) diluído a 1,5% em álcool metílico absoluto (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), durante 24 min, à temperatura ambiente. A seguir, estas lâminas foram lavadas em água destilada, com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena presente ou não nos tecidos. Posteriormente, uma solução de reativação antigênica foi preparada. Para este fim, adicionou-se 180 mL de ácido cítrico 0,1 M (MERCK, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 820 mL de citrato de sódio 0,1 M pH 7,6 (MERCK, São Paulo, São Paulo, Brasil) em um frasco com capacidade de 100 mL. Após a preparação deste reagente, as lâminas foram imersas em solução de reativação antigênica (diluída 1:10 em água destilada), e incubadas em banho-maria 95-98°C, durante 40 min. Este procedimento foi realizado com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Logo após, as lâminas foram retiradas do banho-maria, e armazenadas 20 min à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada durante 10 minutos. Após a lavagem das amostras, estas foram imersas em tampão fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,6) (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). A seguir, os cortes histológicos foram demarcados com caneta (DAKO, Carpinteria, Califórnia,

E.U.A.), sendo novamente imersas em novo tampão PBS, durante 5 min. A seguir, os anticorpos primários monoclonais de rato anti-camundongo (CD11a, CD18) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, E.U.A.) foram diluídos (1:50), em tampão TRIS-HCl (Composição: Tris Base 13,9g, Tris-HCl 60,6g, NaCl 87,66g, pH 7,6) (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.). Após esta etapa, as lâminas foram incubadas com o respectivo anticorpo primário em câmara úmida e em estufa (36-37°C) durante 1 h. A seguir, estas lâminas foram lavadas em dois banhos de tampão PBS, em cubas plásticas. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas, com anticorpo secundário IgG/IgM biotinilado (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.), em câmara úmida por 25 min, à temperatura ambiente. Para cada lâmina foi realizada duas lavagens utilizando-se 1 mL de tampão PBS, por 5 min. Após esta etapa, as amostras foram incubadas com conjugado (Streptavidina-biotina-peroxidase) (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.), em câmara úmida, por 25 min à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas novamente a duas lavagens com tampão PBS, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, preparou-se uma solução de peróxido de hidrogênio (1,5%) (MERCK, São Paulo, São Paulo, Brasil) diluído em álcool metílico absoluto (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), em que as amostras foram imersas durante 24 min, à temperatura ambiente e lavadas durante 10 min em água destilada. A seguir, foi preparada a mesma solução de reativação antigênica descrita anteriormente. As lâminas foram imersas na solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e incubada em banho-maria 95-98°C, durante 40 min. Logo após, as lâminas foram retiradas do banho-maria, e incubadas durante 20 min à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada durante 10 min. Após a lavagem das amostras, estas foram imersas em solução PBS pH 7,6 (Laborclin, São

José dos Pinhais, Paraná, Brasil). A seguir, os cortes histológicos foram demarcados utilizando-se uma caneta para demarcação de lâminas, sendo estas novamente imersas em novo tampão PBS, durante 5 min. Depois dos cortes demarcados, os anticorpos monoclonais de rato anti-camundongo primários (anti-CD11a e anti- CD18) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, E.U.A.) foram diluídos (1:25 e 1:50) respectivamente, com tampão TRIS-HCl pH 7,6. Após a diluição dos anticorpos, as lâminas foram incubadas com o respectivo anticorpo primário em câmara úmida, durante 1 h. A seguir, cada lâmina foi lavada em dois banhos de tampão PBS em cubas plásticas por 5 min. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário IgG/IgM biotinizado, em câmara úmida à temperatura ambiente por 25 min. A seguir foi realizada duas lavagens utilizando-se solução PBS pH 7,6 por 5 min. Após esta etapa, as amostras foram incubadas com conjugado (50 µL por lâmina) (Streptavidina-biotina-peroxidase) em câmara úmida à temperatura ambiente por 25 min. As amostras foram submetidas novamente a duas lavagens com tampão PBS, durante 5 min. A seguir, as amostras foram coradas com 1 mL de diaminobenzidine (DAB) e 2 mL de peróxido de hidrogênio (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.). A seguir, as lâminas foram coradas novamente com hematoxilina (MERCK, São Paulo, São Paulo, Brasil) e a leitura foi realizada em microscópio óptico comum, aumento de 400 x, sendo lido todos os campos da lâmina. O resultado positivo é revelado pelo aparecimento de coloração castanha no tecido. Em todas as análises utilizou-se lâminas controles negativo e positivo (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.).

Para quantificação da positividade, levou-se em conta a intensidade e a extensão da coloração castanha. Dando-se o valor (1) para a coloração de intensidade moderada e o valor (2) para a coloração de intensidade forte. Em

relação ao número de células coradas procedeu-se o seguinte critério, até 1/3 das células coradas valor (1), até 2/3 das células coradas valor (2) e mais de 2/3 das células coradas valor (3). O *score* final se deu pela multiplicação dos valores encontrados da intensidade da coloração e número de células coradas. Portanto o *score*, variou de 0 a 6 (SANNINO e SHOUSA, 1994).

4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.5.1 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre a contagem total e diferencial de leucócitos, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Foi investigado o efeito de fármacos imunossupressores (metotrexato: MTX e ciclosporina A: CsA) sobre a migração de leucócitos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. O estudo do tratamento prévio dos animais com diferentes doses, como também do perfil temporal dos fármacos estudados foi avaliada tanto na primeira (4 h) como na segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos. Para este fim inicialmente diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) da carragenina com diferentes doses de MTX (1-40 mg/kg, i.p.) ou CsA (0,1-20 mg/kg, i.p.). Após a escolha da melhor dose de cada droga, avaliou-se o perfil temporal, tanto para os animais tratados com o MTX, como para a CsA. Desta forma estes animais foram tratados previamente (0,5-48 h) da carragenina. Nestes experimentos, foi observado que para o MTX, a melhor dose foi de 20 mg/kg, i.p., e o melhor tempo de tratamento prévio foi de 24 h. Para a CsA, a melhor dose foi de 10 mg/kg, i.p., administrada 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h. Já na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, ambas as drogas tiveram

como melhor tempo de tratamento prévio 0,5 h, sendo que para o MTX utilizou-se a dose de 40 mg/kg, i.p., e para a CsA a dose de 2 mg/kg, i.p.. Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Quando necessário, o grupo de animais-controle recebeu apenas injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir as drogas testadas. A análise dos leucócitos foi realizada conforme descrito no item 3.4.1, e os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

4.5.2 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre a contagem total de leucócitos no sangue total de camundongos com pleurisia

Foi investigado o efeito do MTX e da CsA sobre os leucócitos, no sangue de camundongos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina. Inicialmente, foram analisadas a migração dos leucócitos em animais tratados previamente com os fármacos acima citados. Diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) com MTX (1-40 mg/kg, i.p.) ou CsA (0,1-20 mg/kg, i.p.). Após esta primeira análise foram estudados novos grupos, agora avaliando-se o tempo resposta de cada imunossupressor estudado. A análise dos parâmetros estudados foi avaliada 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina (SALEH et al., 1996; FRÖDE e MEDEIROS, 2001; FRÖDE et al., 2002). Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados 4 e 48 h após. A análise do hemograma dos camundongos foi realizada segundo os procedimentos descritos no item 3.4.1, os resultados foram expressos em número de células ($\times 10^6$).

4.5.3 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre a contagem de macrófagos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Foi investigado o efeito do MTX e da CsA sobre os níveis de macrófagos, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Sabendo-se que a migração de macrófagos para o sítio de inflamação, ocorre na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, utilizamos este tempo para analisar a migração de macrófagos. Nestes experimentos diferentes grupos de animais foram tratados com MTX (40 mg/kg, i.p.) ou CsA (2 mg/kg, i.p.) e a pesquisa de macrófagos foi avaliada 48 h após a indução da pleurisia. A análise dos macrófagos foi realizada utilizando-se coloração hematoxilina-eosina, discutida no item 3.4.2. Os resultados foram expressos em número total de macrófagos ($\times 10^6$).

4.5.4 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre os níveis da exudação, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Foi investigado o efeito do MTX e da CsA, sobre os níveis de exudação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com solução corante azul de evans (25 mg/kg, i.v) 1 h antes dos experimentos. Posteriormente, os camundongos foram tratados previamente com diferentes doses do MTX (0,5–40 mg/kg, i.p.) 0.5 h antes da pleurisia induzida pela carragenina. Em outro grupo de experimentos, os animais foram tratados previamente com CsA (0,1-20 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes do agente flogístico. Os parâmetros inflamatórios foram analisados 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina.

Na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, diferentes grupos de animais foram tratados previamente com

MTX (1-40 mg/kg, i.p.) ou CsA (0,5-5 mg/kg, i.p.), 0.5 h antes da carragenina e os parâmetros inflamatórios foram analisados 48 h após. Para determinar as concentrações de azul de evans utilizou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas do corante (0,1-50 µg/mL), segundo descrito no item 3.4.3. Os resultados foram expressos em µg/mL.

4.5.5 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre a permeabilidade vascular, em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rins) de camundongos com pleurisia

Foi avaliado o efeito do MTX e da CsA, sobre a permeabilidade vascular em tecidos induzida pela carragenina, em camundongos. Para avaliação do MTX neste parâmetro inflamatório, a dose utilizada foi de 40 mg/kg, i.p. 0.5 h, e para a CsA, 2 mg/kg, i.p., 0.5 h da pleurisia 48 h. Após a indução da pleurisia, os animais foram sacrificados com overdose de éter etílico e os pulmões, baço, rins, coração e fígado foram removidos para análise da permeabilidade vascular, conforme técnica descrita anteriormente no item 3.4.4. Os resultados foram expressos em µg/g de tecido úmido.

4.5.6 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre as concentrações da mieloperoxidase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Foi avaliado as concentrações da mieloperoxidase (MPO), obtidas do lavado pleural de animais-controle (animais com pleurisia) e tratados com os imunossuppressores. O MTX foi administrado na dose de 20 mg/kg, i.p. 24 h e a CsA, 1 mg/kg, 1 h antes da indução da pleurisia 4 h. Já a avaliação deste parâmetro na pleurisia 48 h, o MTX foi administrado na dose de 40 mg/kg, i.p.

e a CsA, 2 mg/kg, i.p., ambos 0,5 h antes da administração da carragenina. Paralelamente grupos de animais-controle foram utilizados. Neste experimento foi administrado 0,1 ml de solução salina estéril e os animais foram também sacrificados 4 e 48 h após (SALEH et al., 1999; FRÖDE e MEDEIROS, 2001). A análise da MPO foi avaliada segundo metodologia descrita no item 3.4.5. Os resultados foram expressos em mU/mL.

4.5.7 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre os níveis da adenosina-deaminase, na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, o MTX foi administrado na dose de 20 mg/kg, i.p. 24 h e a CsA, 1 mg/kg, 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h. Já a avaliação deste parâmetro na pleurisia 48 h, o MTX foi administrado na dose de 40 mg/kg, i.p. e a CsA 2 mg/kg, i.p., ambos 0,5 h antes da administração do agente flogístico. A análise dos parâmetros estudados foi realizada 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina (FRÖDE e MEDEIROS, 2001). Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os fármacos acima citados. Quando necessário, o grupo de animais-controle receberam apenas a injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir os fármacos testados. A análise da ADA foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.6. Os resultados foram expressos em UI/mL.

4.5.8 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre os níveis de nitrito/nitrato (NOx) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, o MTX foi administrado na dose de 20 mg/kg, i.p. 24 h e a CsA, 1 mg/kg, 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h. Já para a avaliação deste parâmetro na pleurisia 48 h, o MTX foi administrado na dose de 40 mg/kg, i.p. e a CsA, 2 mg/kg, i.p., ambos 0.5 h antes da pleurisia. A análise dos parâmetros estudados foi realizada 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina (SALEH et al., 1999). Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os fármacos acima citados. Quando necessário, o grupo de animais-controle receberam apenas injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir os fármacos testados. A análise do (NO) foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.4.7. Os resultados foram expressos em (μM).

4.5.9 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre os leucócitos teciduais (pulmão, baço, rins, fígado e coração) de camundongos com pleurisia

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, o MTX foi administrado na dose de 20 mg/kg, i.p. 0,5 e 24 h e a CsA, 1 mg/kg, 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h. Já para a avaliação deste parâmetro na pleurisia 48 h, o MTX foi administrado na dose de 40 mg/kg, i.p. e a CsA, 2 mg/kg, i.p., ambos 0,5 h antes da pleurisia. A análise dos leucócitos teciduais foi estudada 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina. Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram

sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os fármacos citados. Quando necessário, o grupo de animais-controle recebeu apenas a injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir os fármacos testados. Os resultados foram expressos em parâmetros histológicos descritos no item 3.4.8.

4.5.10 Efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre o aumento de afinidade de moléculas de adesão CD11a/CD18 no pulmão e no baço de camundongos com pleurisia

Para a avaliação destes marcadores leucocitários, o MTX foi administrado na dose de 20 mg/kg, i.p. 0,5 e 24 h e a CsA, 1 mg/kg, 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h. Já para a avaliação destes mesmos parâmetros na pleurisia 48 h, o MTX foi administrado na dose de 40 mg/kg, i.p. 0,5 h antes e a CsA A, 2 mg/kg, i.p. ambos 0,5 h antes da pleurisia 48 h. Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril (NaCl 0,9%) na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os fármacos citados acima. Quando necessário, o grupo de animais-controle recebeu apenas a injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir os fármacos testados. Os resultados foram expressos qualitativamente em *scores* como descrito no item 3.4.9.

4.6 FÁRMACOS E REAGENTES

No estudo aqui relatado, utilizaram-se as seguintes drogas: metotrexate (Wyent, São Paulo, São Paulo, Brasil); ciclosporina A (Novartis, Basel, Suíça); carragenina lambda (grau IV), álcool etílico (70°, 80°, 95° e absoluto), álcool

metílico, eosina amarela, parafina líquida e sólida, formol (Synth, Barueri, São Paulo, Brasil); o-dianizidina 2HCl (3,3'dimetioxibenzedina), *Escherichia coli* (E.C. ATCC 25922), mieloperoxidase de neutrófilos humanos (MPO: 20 U/mg de proteína; 1 unidade de MPO é definida como a atividade da enzima capaz de oxidar 1 μmol de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por minuto à 25°C , anticorpos de rato anti-camundongo ligado ao corante isotiocianato de fluoresceína (I.T.C.F.): anti-CD18, CD11a, sulfanilamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, E.U.A.); solução tampão fosfato (PBS – pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM), corante giemsa, ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.), (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil); fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado, sulfato de zinco, ácido cítrico, formamida, citrato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%), sulfato de amônio, ácido fosfórico (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil); dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamino, nitrito, hematoxilina, água amoniacal, xilol P.A., entellan, nitroprussiato de sódio (Merck, Armstard, Alemanha); azul de Evans, formato de amônio, diaminobenzidina (DAB) (ACROS-Organics, New Jersey ,E.U.A.); éter etílico (Dinamica, São Paulo, São Paulo, Brasil); solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Sanoclear, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil); heparina (Cristalia, São Paulo, São Paulo, Brasil); corante May-Grüwald (Newprov, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil); fosfato de sódio hidratado, fenol, (Reagen, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); azida sódica (Riedel-de-Häen, Seelze, Alemanha); adenosina (Fluka, St. Gallen, Suíça); hidróxido de sódio anticorpo secundário IgG/IgM biotinilado, Streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO, Carpinteria, Califórnia, E.U.A.)

O metotrexato foi diluído em solução salina e a ciclosporina A, diluída em PBS. No dia dos experimentos, quando necessário, as diluições das drogas foram realizadas em solução salina estéril (0,9%) ou PBS à temperatura ambiente.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (exsudação, migração celular, MPO, ADA e NO) foram expressos através da média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas entre migração celular, exsudação, MPO, ADA e NO e entre grupos-controle foram determinadas utilizando-se os testes “t” de Student não-pareado. Quando necessário, o teste de ANOVA foi complementado pelo teste de Dunnett.

Os resultados da análise histológica, bem como imuno-histoquímica foram expressos por meio de scores. Os resultados da análise histológica foram expressos atribuindo-se scores de 0 a 3, sendo 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = abundante (MOTOHIRO et al., 1986; LOSSOS et al., 2000).

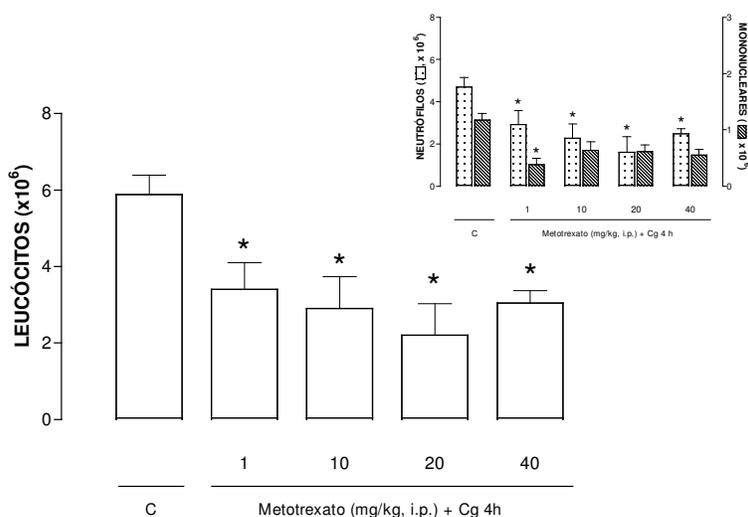
Já a quantificação da análise imunohistoquímica, levou-se em conta a intensidade e a extensão da coloração castanha. Dando-se o valor (1) para a coloração de intensidade moderada e o valor (2) para a coloração de intensidade forte. Em relação ao número de células coradas procedeu-se o seguinte critério, até 1/3 das células coradas valor (1), até 2/3 das células coradas valor (2) e mais de 2/3 das células coradas valor (3). O *score* final se deu pela multiplicação dos valores encontrados da intensidade da coloração e número de células coradas (SANNINO e SHOUSA, 1994). Diferenças estatísticas nos parâmetros inflamatórios observados na técnica de histologia e

imuno-histoquímica, foram determinadas utilizando-se os testes Kruskal-Wallis e quando necessário suplementado pelo teste de Dunn. Valores de P menores que 0,05, foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do Metotrexato sobre a contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

O metotrexato nas doses de 1 a 40 mg/kg, i.p., 0,5 horas antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 h, inibiu a migração leucocitária para a cavidade pleural de animais com pleurisia, quando comparados ao grupo controle ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $5,87 \pm 0,51$; 1 mg/kg: $3,3 \pm 0,70$; 10 mg/kg: $2,90 \pm 0,82$; 20 mg/kg: $2,21 \pm 0,82$ e 40 mg/kg: $3,05 \pm 0,32$) ($P < 0,05$) (Figura 7). Esta inibição ocorreu principalmente às custas de polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $4,69 \pm 0,45$; 1 mg/kg: $2,91 \pm 0,66$; 10 mg/kg: $2,26 \pm 0,68$; 20 mg/kg: $1,60 \pm 0,74$; 40 mg/kg: $2,49 \pm 0,24$) ($P < 0,05$) (Figura 7 *inset*). Além disso, este fármaco na dose de 1 mg/kg, i.p., foi efetivo em inibir também os mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $1,18 \pm 0,12$; 1 mg/kg: $0,38 \pm 0,11$) ($P < 0,05$)



(Figura 7 *inset*).

Figura 7 – Efeito do metotrexato na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito do metotrexato (1-40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural. Inset, Efeito deste fármaco sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e as barras verticais o SEM. * $P < 0,05$.

Na análise do perfil temporal, o metotrexato demonstrou uma resposta bifásica, pois na dose de 20 mg/kg, i.p. administrado (0,5 e 24 h) antes do agente flogístico, inibiu a migração celular para a cavidade pleural de camundongos na primeira fase (4 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $5,87 \pm 0,51$; MTX 0,5 h: $2,21 \pm 0,82$; MTX 24 h: $2,4 \pm 0,17$) ($P < 0,01$) (Figura 8). Este efeito inibitório sobre a migração celular, se deu às custas de polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $4,69 \pm 0,45$; MTX 0,5 h: $1,60 \pm 0,74$; MTX 24 h: $1,93 \pm 0,11$) (Figura 8 *inset*) ($P < 0,01$).

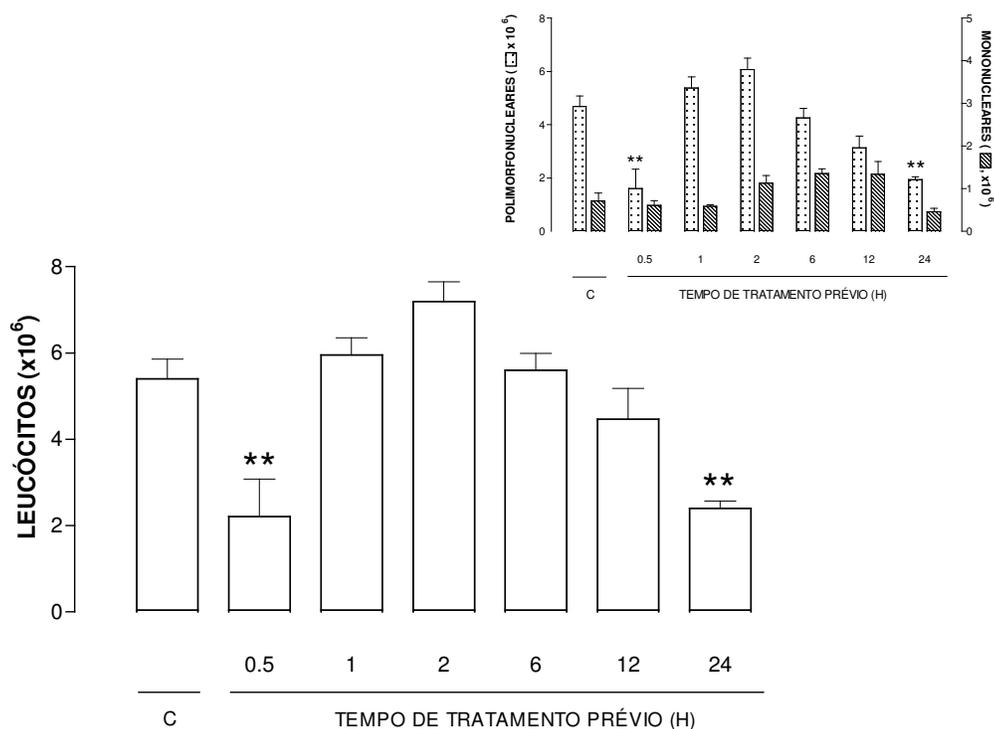
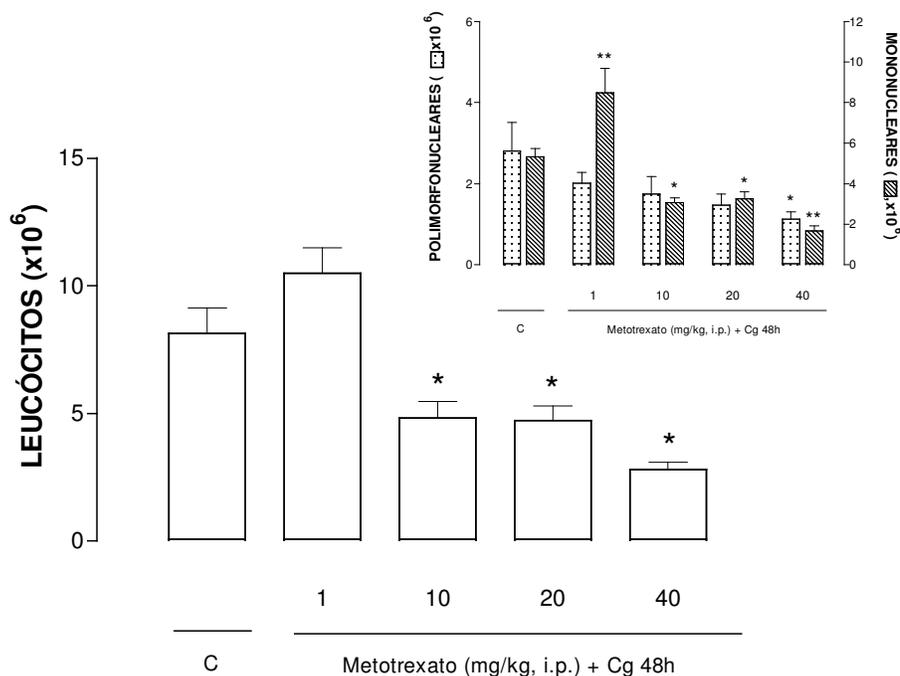


Figura 8 – Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado de 0,5 a 24 h antes da administração da carragenina, na primeira (4 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de leucócitos. Inset, Efeito deste fármaco sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** $P < 0,01$.

Na segunda fase da pleurisia (48 h) o metotrexato administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, i.p., inibiu a migração leucocitária para a cavidade pleural ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $8,12 \pm 1,00$; 10 mg/kg: $4,82 \pm 0,63$; 20 mg/kg: $4,72 \pm 0,56$ e 40 mg/kg: $2,80 \pm 0,27$) ($P < 0,05$) (Figura 9). Esta inibição se deu às custas de mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $5,32 \pm 0,41$; 10 mg/kg: $3,07 \pm 0,21$; 20 mg/kg: $3,25 \pm 0,34$ e 40 mg/kg: $1,67 \pm 0,24$) ($P < 0,05$) (Figura 9 *inset*). Além disso, a dose de 40 mg/kg, i.p., também foi capaz de inibir a migração de polimorfonucleares para a cavidade pleural ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $2,80 \pm 0,71$; 40



mg/kg: $1,13 \pm 0,18$) ($P < 0,05$) (Figura 9 *inset*).

Figura 9 - Efeito do metotrexato na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito do metotrexato (1-40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural. Inset, Efeito deste fármaco sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Na análise do perfil temporal da segunda (48 h) fase da pleurisia, o metotrexato foi administrado de 0,5 – 24 h antes da indução da pleurisia. Como resultado observamos que todos os tempos de tratamento prévio superiores a 0,5 h, promoverem a morte de 100 % dos animais (Resultados não mostrados). Devido a este efeito, nos experimentos subseqüentes utilizou-se o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p., administrado 0,5 h antes da pleurisia 48 h. Os resultados obtidos revelam que o MTX (40 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes inibiu os leucócitos ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $8,12 \pm 1,00$; 40 mg/kg: $2,80 \pm 0,27$) ($P < 0,05$) (Figura 10), às custas de polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $2,80 \pm 0,70$; 40 mg/kg: $1,13 \pm 0,18$) e de mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $5,32 \pm 0,41$; 40 mg/kg: $1,67 \pm 0,24$) ($P < 0,05$) (Figura 10 *inset*).

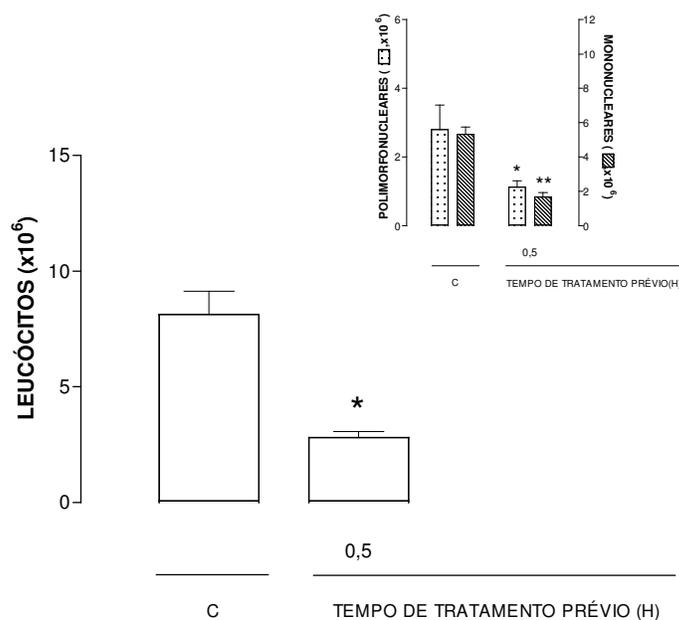


Figura 10 – Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da administração da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de leucócitos. Inset, Efeito deste fármaco sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

5.2 Efeito do metotrexato sobre a contagem de macrófagos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Para avaliação deste parâmetro inflamatório, utilizou-se apenas os grupos de animais com pleurisia 48 h, devido aos macrófagos fazerem parte principalmente da resposta imune adaptativa e serem ativados no local da inflamação 48 h após administração do agente flogístico. Quando os animais foram tratados com metotrexato (40 mg/kg, i.p.), 0,5 h antes da carragenina 48 h, observou-se uma diminuição significativa de leucócitos totais (65,5%), de mononucleares (68,6%), bem como de macrófagos (83,6%) ($P < 0,01$) (Figura 11).

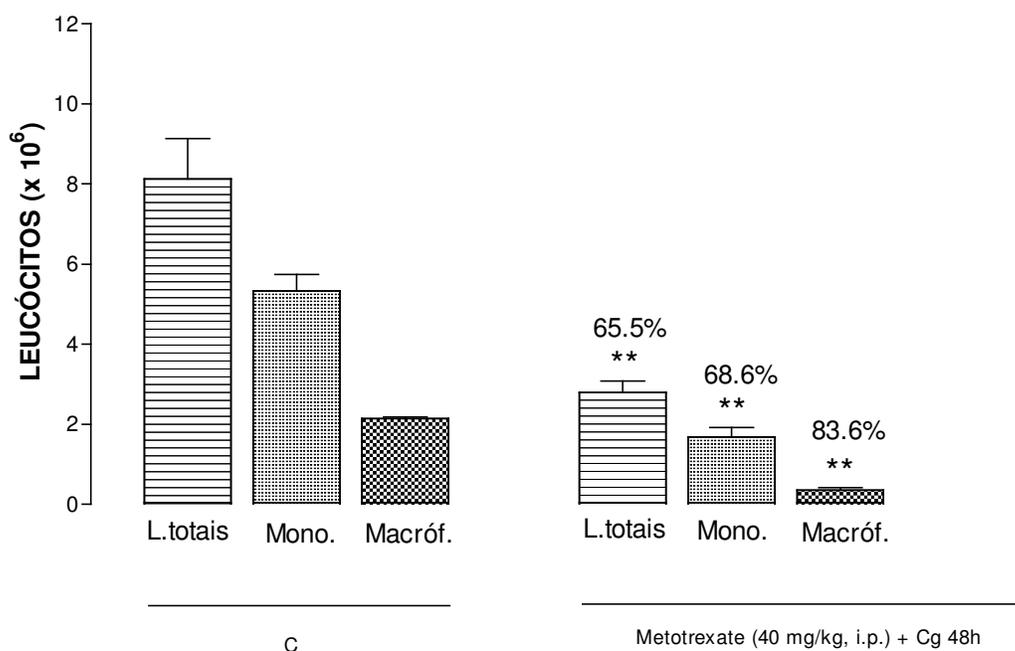


Figura 11 - Efeito do metotrexato na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos totais (L. totais), mononucleares (Mono.) e macrófagos (Macróf.) na cavidade pleural. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Os valores descritos acima das barras referem-se a percentagem de inibição, em relação ao grupo controle (animais tratados somente com Cg 1%/cav.). Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e as barras verticais o SEM. ** $P < 0,01$.

5.3 Efeito do metotrexato sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia

Na análise do hemograma dos camundongos tratados previamente (0,5 e 24 h) com metotrexato (20 mg/kg, i.p. ou 40 mg/kg, i.p.) não observou-se diferenças significativas quando estes animais foram avaliados 4 e 48 h após a indução da pleurisia ($P > 0,05$) (Resultados não mostrados).

5.4 Efeito do Metotrexato sobre a exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

A administração do metotrexato nas doses de 1 a 40 mg/kg, 0,5 h antes da indução da pleurisia 4 h, não foi capaz de inibir os níveis de exsudação ($P > 0,05$) (Resultados não mostrados).

Po outro lado, na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória o metotrexato nas doses de 1, 10, 20 e 40 mg/kg, i.p. 0,5 h antes da indução da pleurisia, inibiu os níveis de exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia ($\mu\text{g/mL}$) (Cg 48 h: $16,70 \pm 1,84$; 1 mg/kg: $7,56 \pm 0,59$; 10 mg/kg: $4,78 \pm 0,73$; 20 mg/kg: $5,89 \pm 0,77$ e 40 mg/kg: $4,61 \pm 0,63$) ($P < 0,01$) (Figura 12).

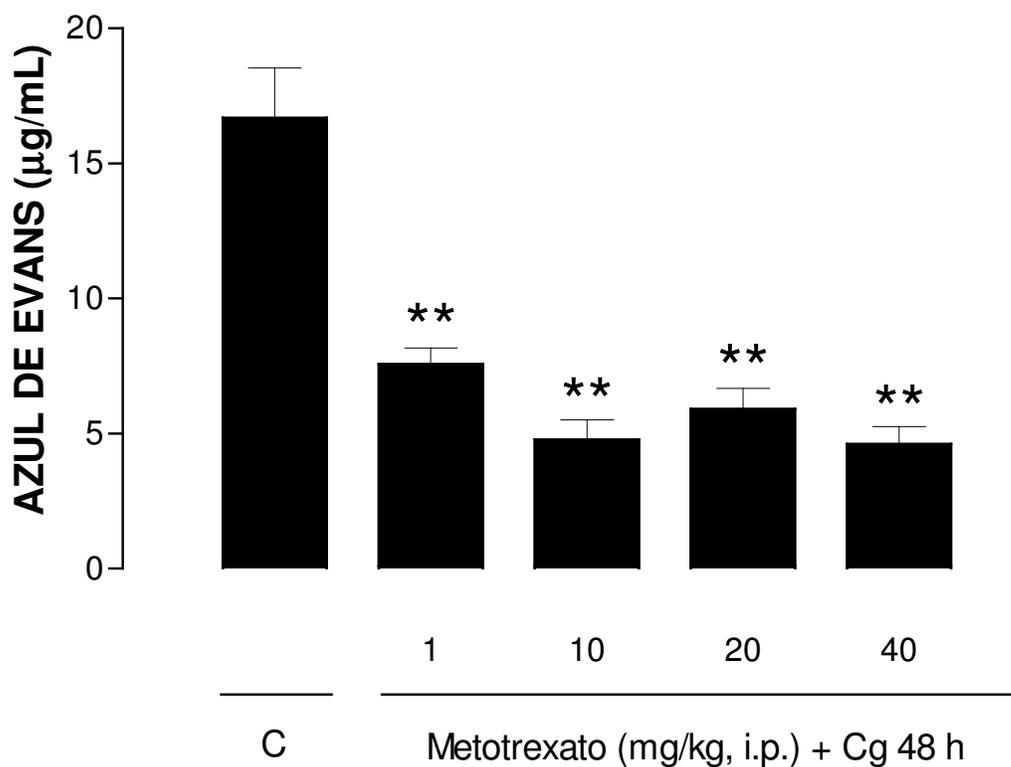


Figura 12 - Efeito do metotrexato (1 - 40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da administração da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito do metotrexato (1 - 40 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de exsudação. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** $P < 0,01$.

Ao analisarmos o perfil temporal do metotrexato, estudando-se a exsudação, verificamos que apenas o tempo de tratamento prévio de 0,5 h antes da pleurisia 48 h foi avaliado, devido a morte de todos os animais dos grupos de tratamento prévio superior a 0,5 h. Os resultados revelam que o MTX na dose de 40 mg/kg, i.p. administrado 0,5 h antes da carragenina inibiu de forma significativa a exsudação na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina ($\mu\text{g/mL}$) (Cg 48 h: $16,69 \pm 1,84$; MTX 0,5 h: $4,61 \pm 0,63$) ($P < 0,01$) (Figura 13).

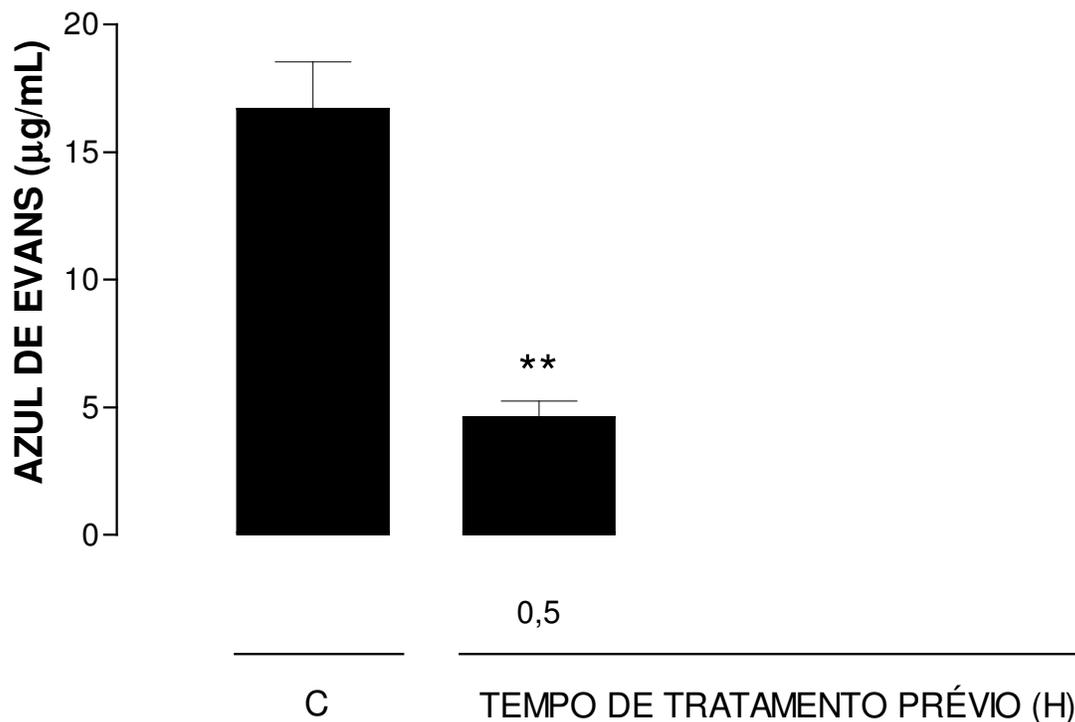


Figura 13 - Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 antes da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de exsudação. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** P < 0,01.

5.5 Efeito do Metotrexato sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, baço, rins, fígado e coração) de camundongos com pleurisia

Para avaliação deste parâmetro inflamatório, utilizou-se apenas os grupos de animais com pleurisia 48 h, devido a estes grupos terem apresentado inibição dos níveis de azul de Evans no lavado pleural de camundongos com pleurisia, em experimentos anteriores. Além disso, foi utilizado o tempo de

tratamento de 0,5 h, antes da indução da pleurisia 48 h, devido a ser o melhor tempo de tratamento prévio observado neste protocolo experimental.

Nos animais tratados com metotrexato (40 mg/kg, i.p.), 0,5 h antes da pleurisia 48 h, observou-se uma diminuição significativa da exsudação apenas nos pulmões ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) (Cg 48h: $10,09 \pm 1,06$; MTX: $7,81 \pm 0,50$) ($P < 0,05$) (Figura 14).

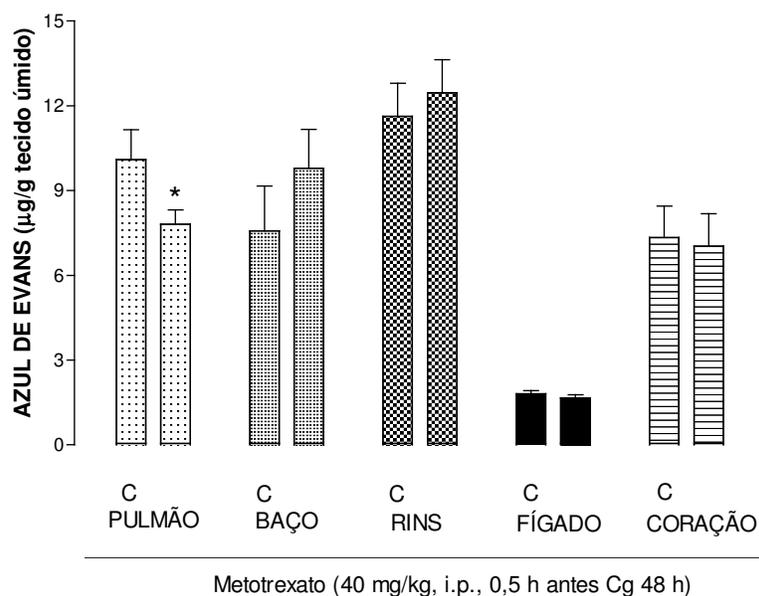


Figura 14 - Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 antes da administração da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.) sobre a permeabilidade vascular em tecidos. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 10 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$.

5.6 Efeito do metotrexato sobre as concentrações da mieloperoxidase, adenosina-deaminase e nitrato/nitrito (NOx) no lavado pleural de camundongos com pleurisia

O metotrexato (20 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 e 24 h antes da carragenina, inibiu de forma significativa as concentrações de mieloperoxidase na pleurisia induzida pela carragenina 4 h (mU/mL): (Cg 4 h: $631,15 \pm 42,8$; MTX 0,5 h: $441,47 \pm 55,6$ e MTX 24 h: $348,79 \pm 25,3$) ($P < 0,05$) (Figura 15A).

Avaliando-se o mesmo parâmetro na segunda (48 h) fase da pleurisia, observamos que o metotrexato (40 mg/kg, i.p.), 0,5 h antes da administração da carragenina, diminuiu também de forma significativa os níveis da MPO (mU/mL) (Cg 48 h: $156,28 \pm 13,9$; MTX 0,5 h: $71,32 \pm 5,0$) ($P < 0,05$) (Figura 15B).

Quando o metotrexato (20 mg/kg, i.p.) foi administrado 0,5 e 24 h antes da carragenina 4 h, causou um aumento significativo nos níveis da adenosina-deaminase, quando administrado 0,5 h antes (U/L) (Cg 4 h: $5,5 \pm 0,62$; MTX 4 h: $12,20 \pm 0,86$) ($P < 0,01$) (Figura 16A), enquanto o tempo de tratamento prévio de 24 h, não causou mudanças significativas nas concentrações desta enzima ($P > 0,05$) (Figura 16A). Na segunda fase da pleurisia (48 h), o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da carragenina 48 h, promoveu inibição significativa nas concentrações desta enzima (U/L) (Cg 48 h: $7,27 \pm 0,70$; MTX 0,5 h: $4,75 \pm 0,74$) ($P < 0,05$) (Figura 16).

O metotrexato na dose de 20 mg/kg, i.p., 0,5 e 24 h antes da carragenina 4 h, demonstrou também uma diminuição significativa dos níveis de nitrito/nitrato (NOx) (μM) (Cg 4 h: $22,41 \pm 2,00$; MTX 0,5 h: $5,45 \pm 0,87$; MTX 24 h: $3,15 \pm 0,20$) ($P < 0,01$) (Figura 17A). Na avaliação da segunda fase (48 h) da pleurisia, o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da carragenina, também diminuiu significativamente este parâmetro inflamatório (NOx) (μM) (Cg 48 h: $10,64 \pm 1,1$; MTX 0,5 h: $4,29 \pm 0,2$) ($P < 0,01$) (Figura 17B).

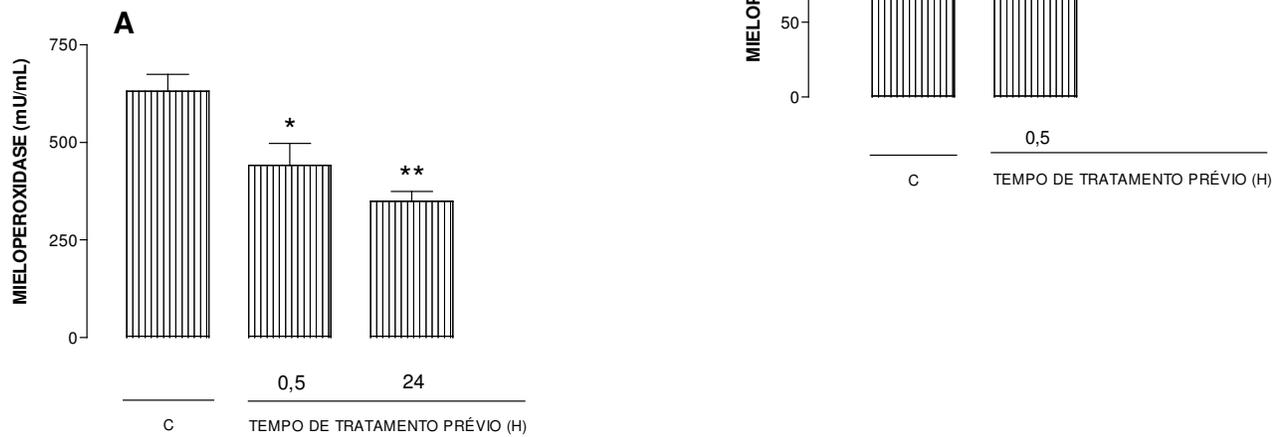


Figura 15 - Efeito do Metotrexato, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A - Efeito do Metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 e 24 h antes da carragenina 4 h, sobre os níveis e mieloperoxidase na cavidade pleural. B - Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina 48 h, sobre os níveis de mieloperoxidase na cavidade pleural C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01.

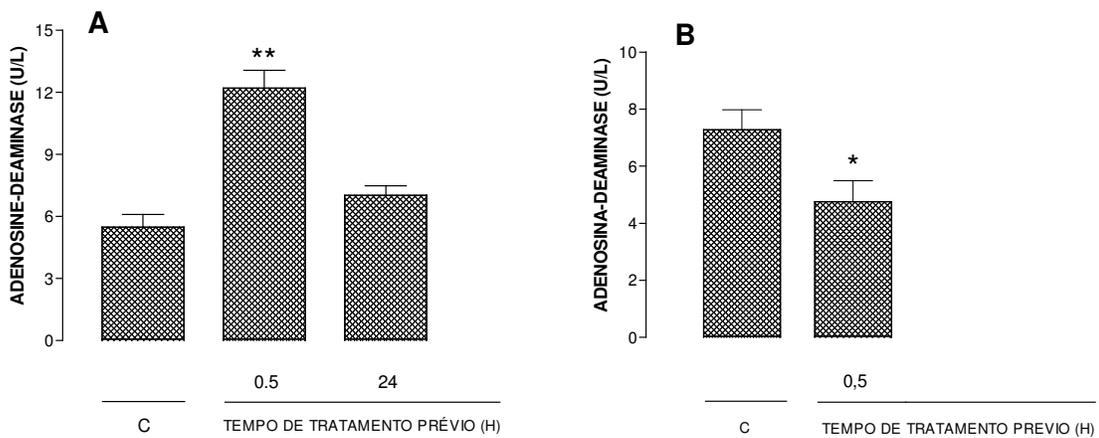


Figura 16 - Efeito do Metotrexato, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A - Efeito do Metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 e 24 h antes da carragenina, sobre os níveis de adenosina-deaminase na cavidade pleural. B - Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina 48 h, sobre os níveis de adenosina-deaminase. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * P < 0,05.

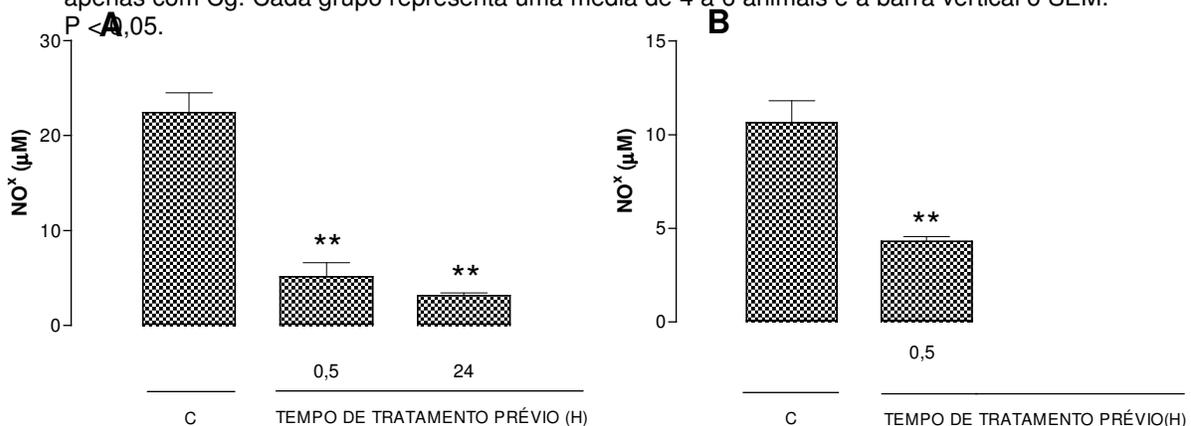


Figura 17 - Efeito do Metotrexato, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A - Efeito do Metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 e 24 h antes da carragenina 4 h, sobre os níveis de nitrato/nitrito (NOx) na cavidade pleural. B - Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina 48 h, sobre os níveis de nitrato e nitrito na cavidade pleural C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** P < 0,01.

5.7 Efeito do Metotrexato sobre a organização celular em tecidos (pulmão, baço, fígado, baço, coração e rins) de camundongos com pleurisia

A pesquisa do infiltrado celular em tecidos foi realizada por meio de técnicas histológicas, observando-se o tipo de leucócitos no pulmão, baço, rins, fígado e coração, além do grau de alteração morfológica celular tecidual em animais tratados com os imunossupressores citados anteriormente. As próximas figuras identificadas como (A) revelam a análise histológica dos tecidos (pulmão, baço, fígado, coração e rins) de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl 0,9%). Neste estudo o metotrexato na dose de 20 mg/kg, i.p. administrado 0,5 e 24 h, diminuiu de forma significativa a congestão entre os septos alveolares pulmonares (de grau 3: abundante, para grau 2: moderado) ($P < 0,01$), além do número de leucócitos do tipo polimorfonucleares (do grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figuras 17C e D), quando comparados ao grupo controle (Figura 18B).

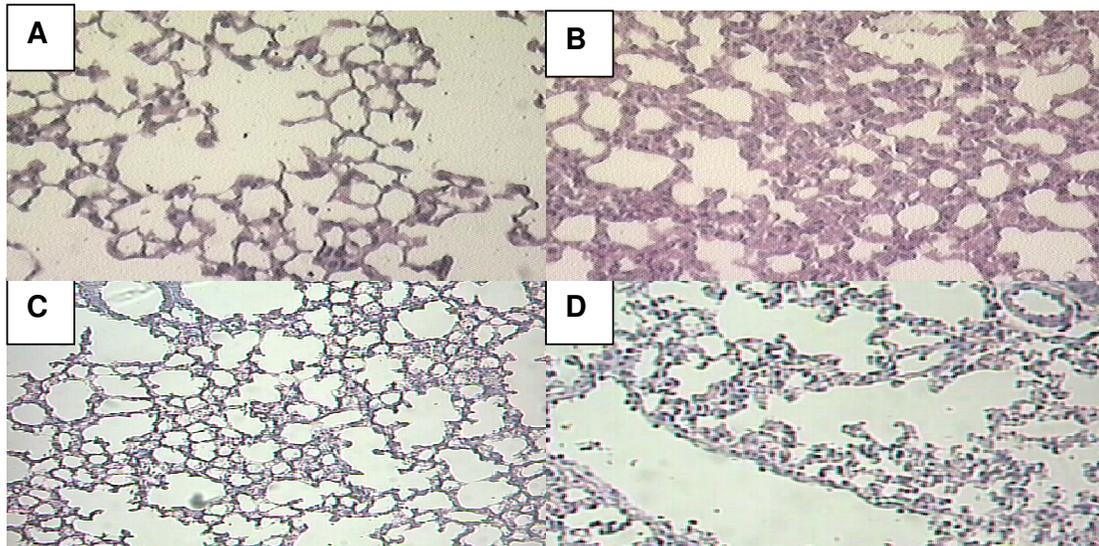


Figura 18 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de pulmões de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina (1%). Efeito do Metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h (C) ou 24 h (D) antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular nos pulmões (Aumento de 200 x).

Na segunda (48 h) fase da pleurisia, o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p., (0,5 h antes) foi capaz de diminuir significativamente a infiltração de polimorfonucleares, bem como de mononucleares (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), além de diminuir a congestão entre os septos alveolares pulmonares (de grau 3: abundante, para grau 2: moderado) ($P < 0,01$) (Figura 18C) ao compararmos com o grupo controle (Figura 19B).

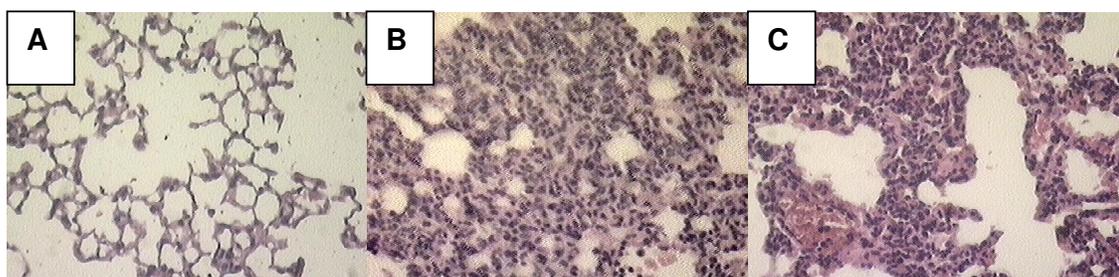


Figura 19 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de pulmões de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina (1%). C - Efeito do Metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular nos pulmões (Aumento de 200 x).

Ao avaliarmos o efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p., 0,5 e 24 h antes da carragenina) na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, sobre a organização celular no fígado, evidenciamos que este diminuiu de forma significativa a degeneração hidrópica (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), melhorou a discariose celular (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), além de diminuir a infiltração de polimorfonucleares e de mononucleares (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figura 20C e D) em relação ao grupo controle (Figura 20B).

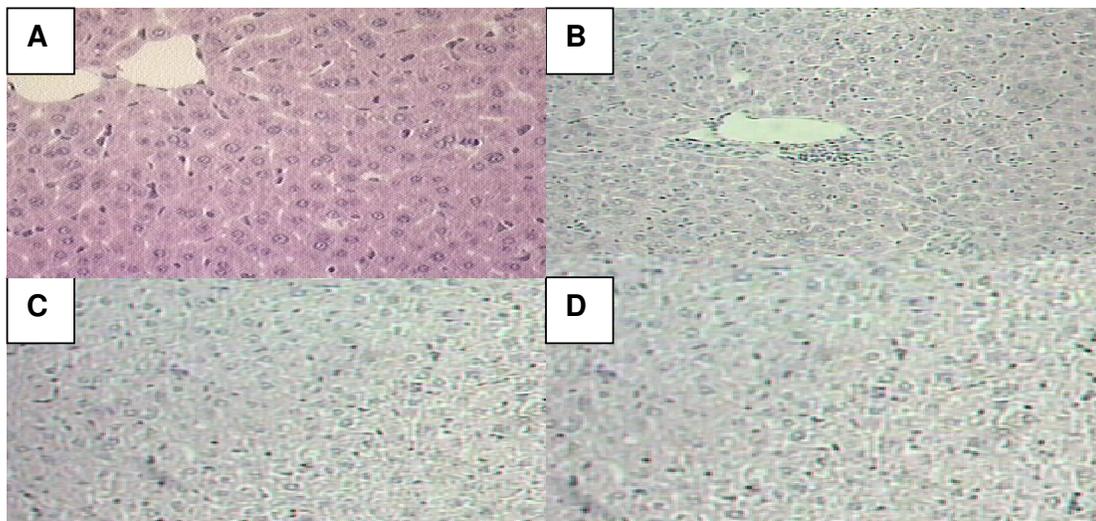


Figura 20 – Análise comparativa de cortes histopatológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina (1%). Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h (C) ou 24 h (D) antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular no fígado (Aumento de 200 x).

Na avaliação do fígado na segunda (48 h) fase da pleurisia, observamos que o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p., promoveu uma diminuição significativa na degeneração hidrópica (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), no número de grupamentos de células inflamatórias (de grau 3: abundante, para grau 2: moderado) ($P < 0,01$), diminuição dos focos de necrose (de grau 3: abundante, para grau 2: moderado) ($P < 0,01$), além da diminuição da discariose nuclear (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto)

($P < 0,01$), de camundongos com pleurisia (Figura 21C) em relação ao grupo controle (Figura 21B).



Figura 21 – Análise comparativa de cortes histopatológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratado solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina (1%). C- Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular no fígado (Aumento de 200 x).

A seguir avaliamos a organização celular no baço, quando os animais foram tratados com metotrexato na dose de 20 mg/kg, i.p., 0,5 e 24 h antes da indução da pleurisia 4 h, podemos observar que não houve modificação na polpa branca, mas sim uma diminuição significativa na esplenite com diminuição no número de polimorfonucleares observados na polpa vermelha (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figura 22C e D) em relação ao grupo controle (Figura 22B).

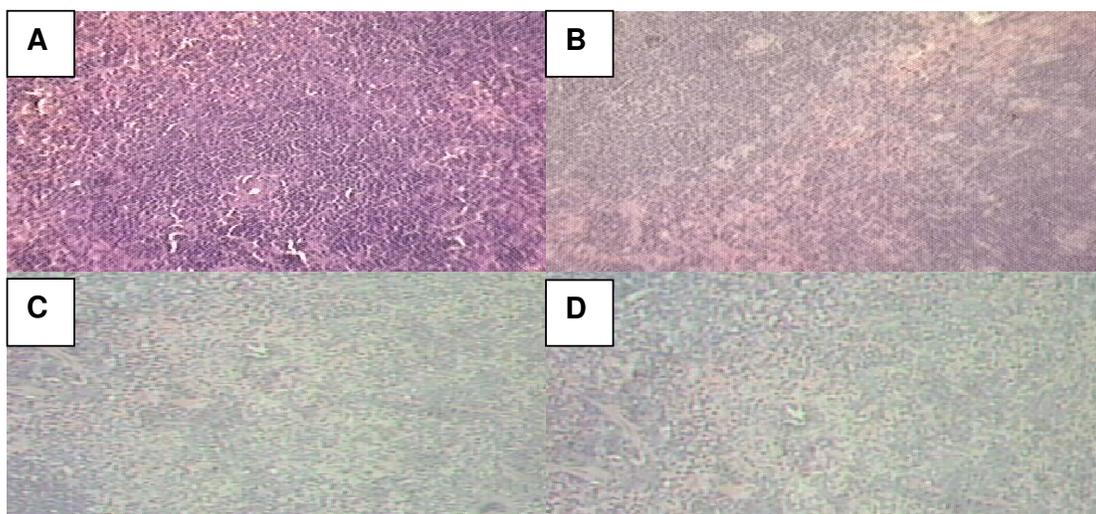


Figura 22 – Análise comparativa de cortes histopatológicos do baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h (C) ou 24 h (D), sobre a infiltração e organização celular no baço (Aumento de 200 x).

Na segunda (48 h) fase da pleurisia, o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p. administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia, foi capaz de diminuir a esplenite com diminuição do número de mononucleares, na polpa vermelha (de grau 3: abundante, para grau 2: moderado) ($P < 0,01$), bem como o número de centros germinativos da polpa branca no baço (de grau 3: abundante, para grau 2: moderado) ($P < 0,01$) (Figura 23C) em relação ao grupo controle (Figura 23B).

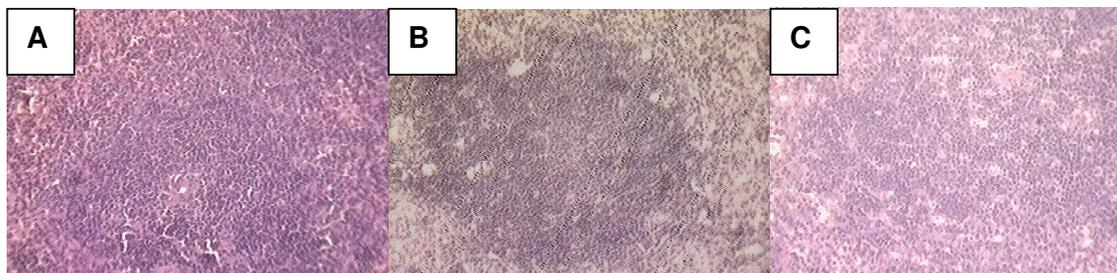


Figura 23 – Análise comparativa de cortes histopatológicos do baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular no baço (Aumento de 200 x).

Além disso, o metotrexato administrado nas doses de 20 ou 40 mg/kg, i.p., antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 ou 48 h, respectivamente, não alterou a resposta inflamatória no coração e nos rins de camundongos com pleurisia ($P > 0,05$) (Resultados não mostrados).

5.8 Efeito do Metotrexato sobre a expressão de CD11a/CD18 em tecidos (pulmão e baço) de animais com pleurisia

As moléculas de adesão (CD11a e CD18) foram pesquisadas no pulmão e no baço de camundongos com pleurisia, por meio da técnica de imunohistoquímica utilizando-se para isso anticorpos monoclonais de rato anti-camundongos. As figuras identificadas como (A) revelam a análise imunohistoquímica dos tecidos de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e as figuras (B) animais tratados com carragenina 1%/cav (4 ou 48 h).

Nos pulmões, o metotrexato na dose de 20 mg/kg, i.p. administrado 0,5 e 24 h, diminuiu o número de moléculas de adesão do tipo CD11a: de *score* 1, para *score* 0 ($P < 0,01$) (Figura 24C e D).

Já na segunda (48 h) fase da pleurisia, podemos observar que o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p. foi capaz de diminuir significativamente a expressão de moléculas de adesão do tipo CD11a: de *score* 4, para *score* 0 ($P < 0,01$) (Figura 25C).

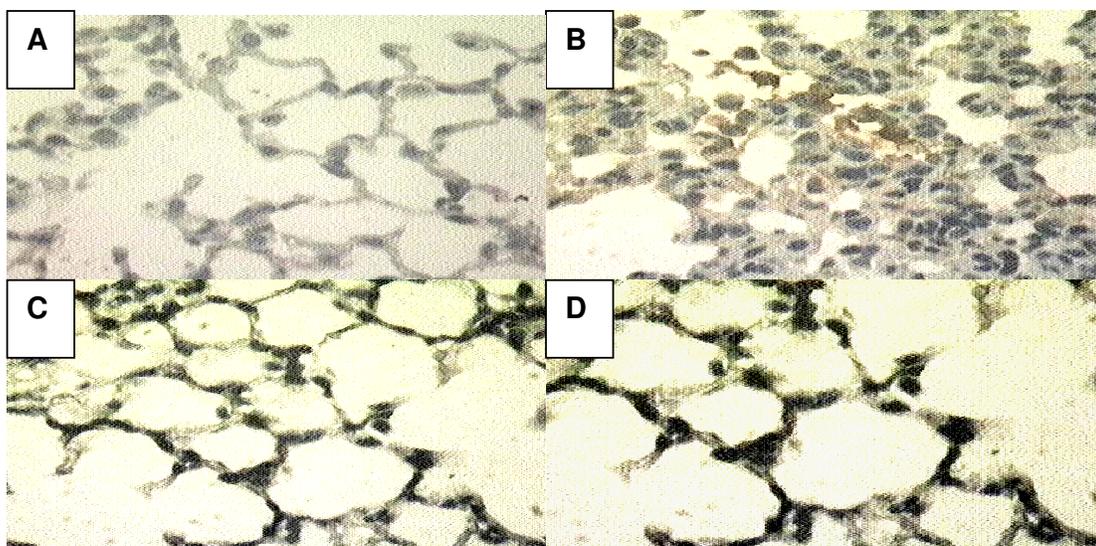


Figura 24 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD11a, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina 1 %/cav.. C- Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD11a no pulmão. D - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 24 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD11a no pulmão (Aumento de 400 x).

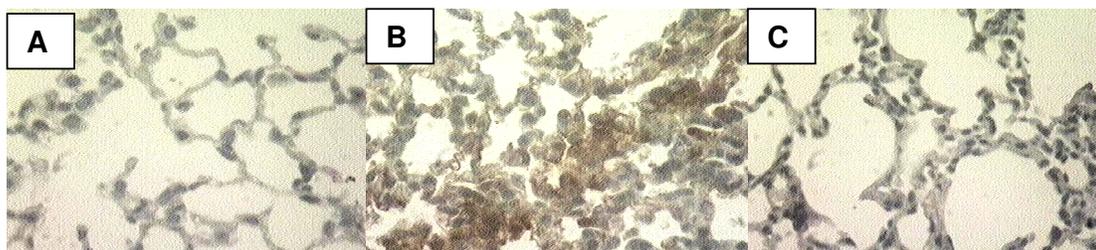


Figura 25 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD11a, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD11a no pulmão (Aumento de 400 x).

Em relação aos marcadores celulares do tipo CD18, estes foram significativamente reduzidos, nos pulmões de *score* 2 para *score* 1 ($P < 0,01$) (Figura 26C e D), em ambos os tempos de tratamento prévio estudados, quando comparados ao grupo controle.

Avaliando a expressão deste mesmo parâmetro nos pulmões na segunda (48 h) fase da pleurisia, podemos observar que o metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p. não foi capaz de diminuir a expressão de moléculas de adesão do tipo CD18 *score* 4 ($P > 0,05$) (Figura 27C).

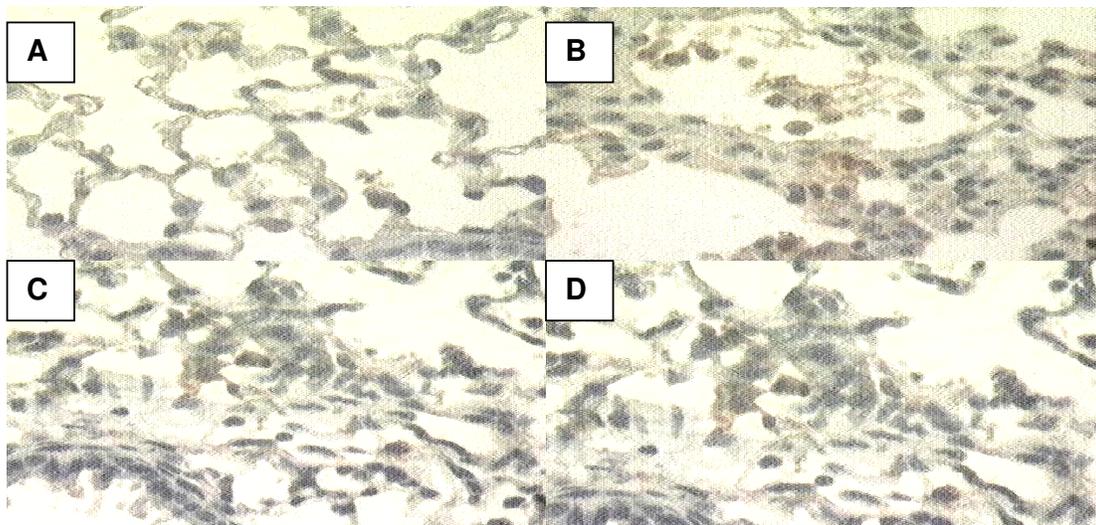


Figura 26 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no pulmão. D - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 24 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no pulmão (Aumento de 400 x).

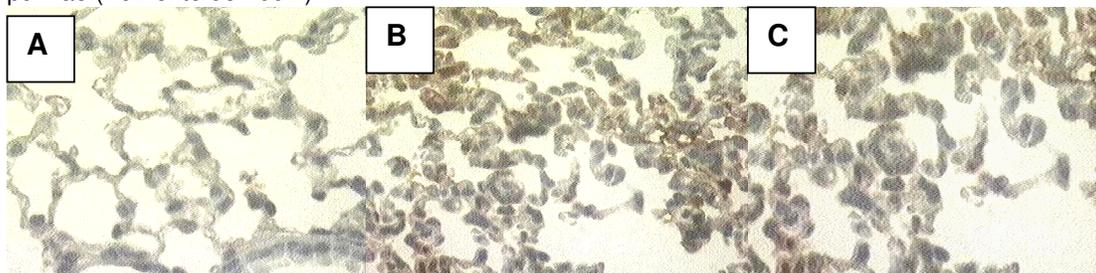


Figura 27 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A –

Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no pulmão (Aumento de 400 x).

Analisando a expressão da moléculas de adesão CD11a, no baço de camundongos com pleurisia induzida pela carragenina 4 h, podemos observar que o metotrexato na dose de 20 mg/kg, i.p. administrado 0,5 e 24, diminuiu significativamente a expressão desta moléculas de *score 2*, para *score 0* em ambos os tempos de tratamento prévio ($P < 0,01$) (Figura 28C eD).

Já na segunda (48 h) fase da pleurisia, a expressão de moléculas do tipo CD11a no baço, foram reduzidas de *score 2*, para *score 1*, quando comparados a grupos controle (B) ($P < 0,01$) (Figura 29C).

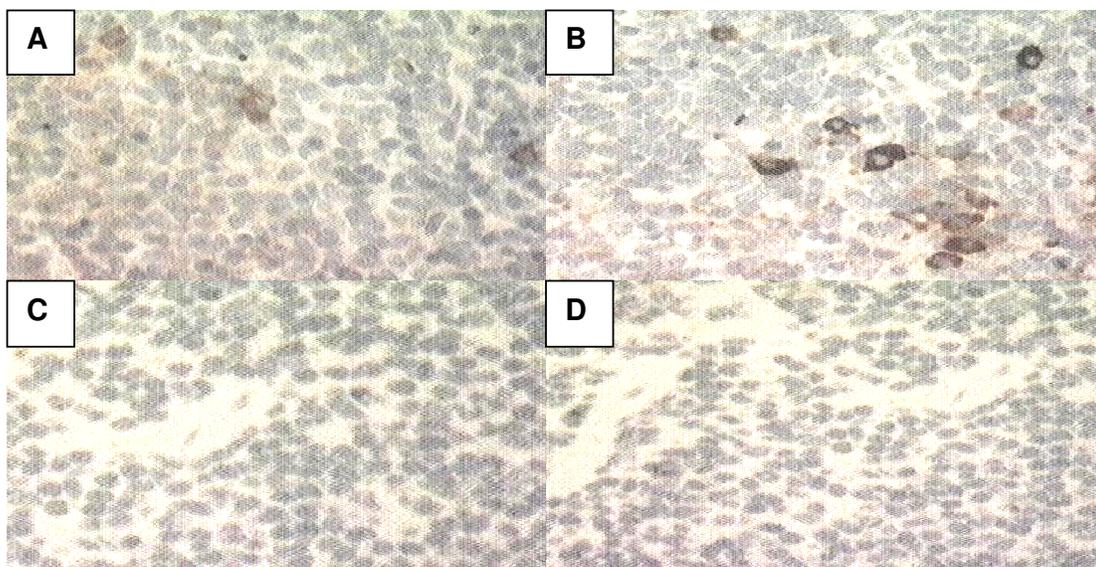


Figura 28 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD11a, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a presença de molécula de adesão CD11a no baço. D - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 24 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD11a no baço (Aumento de 400 x).

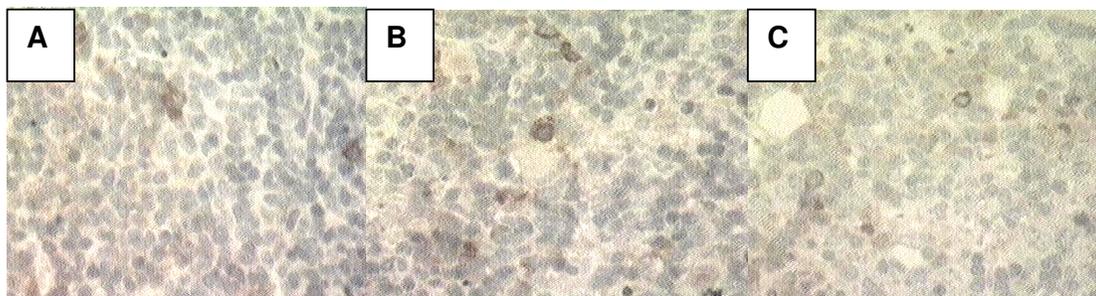


Figura 29 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD11a, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD11a no baço (Aumento de 400 x).

Avaliando, as moléculas de adesão do tipo CD18 no baço, podemos evidenciar uma diminuição na sua expressão de *score* 4, para *score* 1 ($P < 0,01$) (Figura 30C e D).

Já na segunda (48 h) fase da pleurisia, quando os animais foram tratados com metotrexato na dose de 40 mg/kg, i.p. 0,5 h antes, as moléculas do tipo CD18, foram reduzidas de *score* 4, para *score* 2 ($P < 0,01$) (Figura 31C).

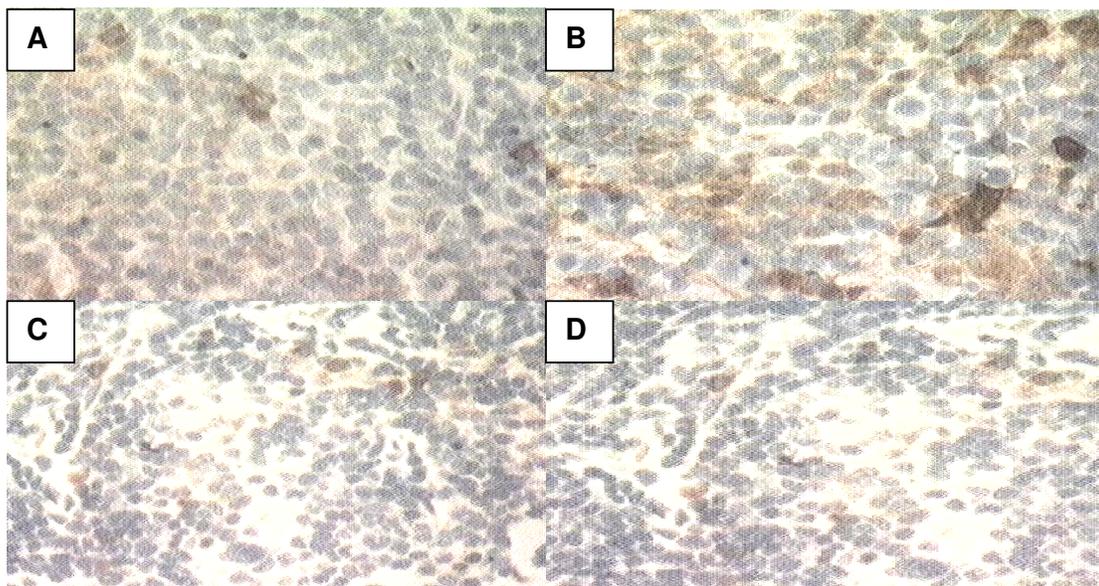


Figura 30 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no baço. D - Efeito do metotrexato (20 mg/kg, i.p.), administrado 24 h antes da carragenina, sobre a presença de molécula de adesão CD18 no baço (Aumento de 400 x).

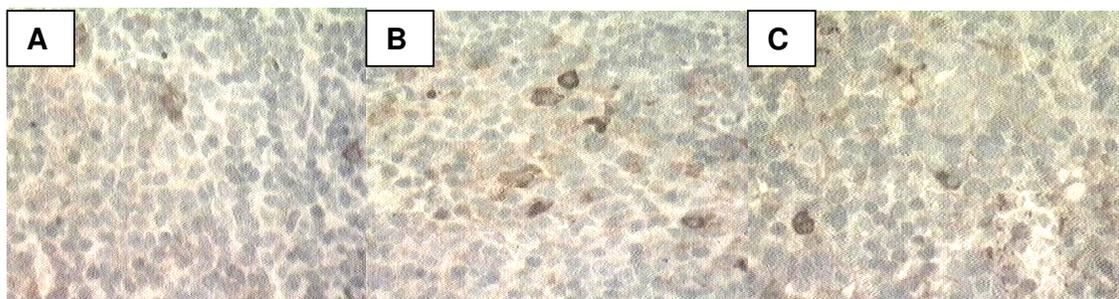
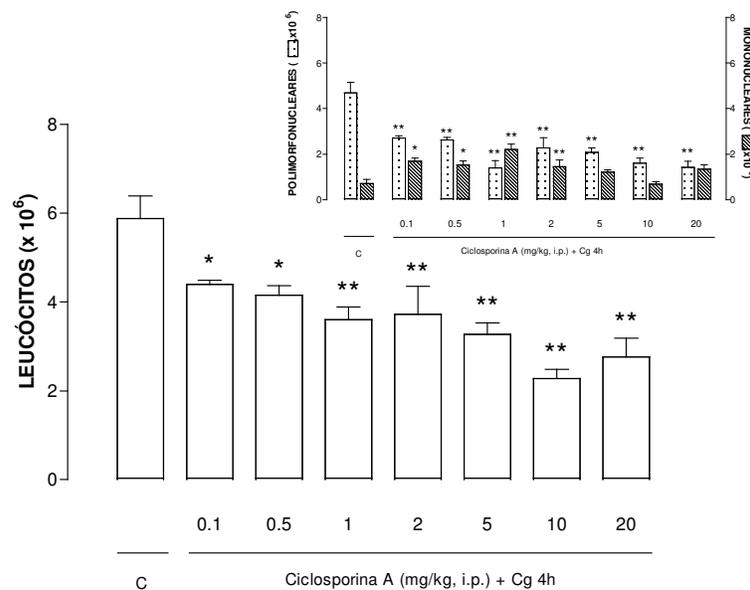


Figura 31 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito do metotrexato (40 mg/kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no baço (Aumento de 400 x).

5.9 Efeito da Ciclosporina A sobre a contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

A ciclosporina A, quando administrada nas doses de (0,1–20 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da pleurisia induzida pela carragenina, foi capaz de inibir significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais com pleurisia ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $5,87 \pm 0,51$; 0,1 mg/kg: $4,4 \pm 0,09$; 0,5 mg/kg: $4,15 \pm 0,22$; 1 mg/kg: $3,6 \pm 0,29$; 2 mg/kg: $3,72 \pm 0,62$; 5 mg/kg: $3,27 \pm 0,25$; 10 mg/kg: $2,28 \pm 0,20$; 20 mg/kg: $2,76 \pm 0,42$) ($P < 0,05$) (Figura 32). Esta inibição se deu às custas de polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $4,69 \pm 0,45$; 0,1 mg/kg: $2,71 \pm 0,08$; 0,5 mg/kg: $2,62 \pm 0,11$; 1 mg/kg: $1,39 \pm 0,30$; 2 mg/kg: $2,27 \pm 0,44$; 5 mg/kg: $2,07 \pm 0,20$; 10 mg/kg: $1,59 \pm 0,23$; 20 mg/kg: $1,41 \pm 0,26$) ($P < 0,05$)



(Figura 32 *inset*).

Figura 32 – Efeito da ciclosporina A, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.). Efeito da ciclosporina A (0,1-20 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural. Inset, Efeito deste fármaco sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controles, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Na análise do perfil temporal a ciclosporina A, na dose de 1 mg/kg, i.p., diminuiu significativamente o acúmulo de leucócitos na cavidade pleural,

quando administrada de 0,5 a 4 h antes da carragenina ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $5,87 \pm 0,51$; CsA 0,5 h: $3,60 \pm 0,29$; CsA 1 h: $2,90 \pm 0,42$; CsA 2 h: $2,97 \pm 0,90$; CsA 4 h: $4,17 \pm 0,25$) ($P < 0,05$) (Figura 33). Esta inibição de leucócitos se deu às custas de polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $4,69 \pm 0,45$; CsA 0,5 h: $1,39 \pm 0,30$; CsA 1 h: $1,60 \pm 0,33$; CsA 2 h: $1,62 \pm 0,44$; CsA 4 h: $2,95 \pm 0,34$) ($P < 0,01$) (Figura 33 *inset*).

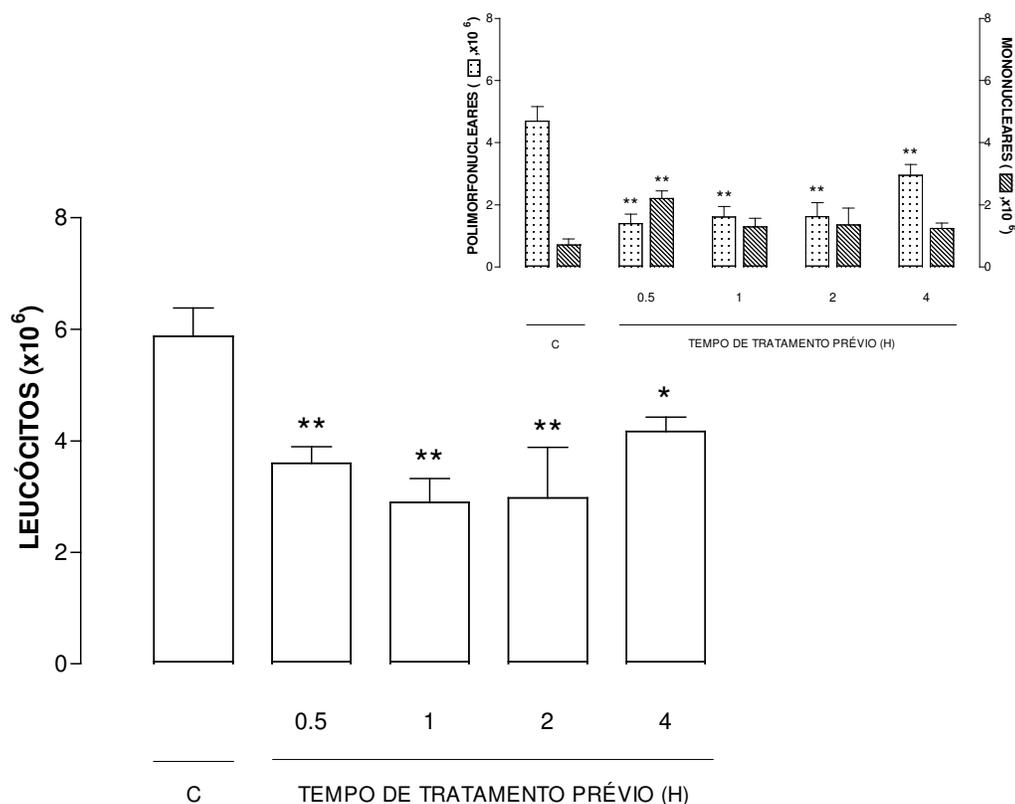


Figura 33 – Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 a 4 h antes da administração da carragenina (1%/cav.), na primeira (4 h) fase da pleurisia, em camundongos. Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de leucócitos. Inset, Efeito desta droga sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Na segunda fase da pleurisia (48 h) a ciclosporina A, apenas na dose de 2 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina, foi capaz de inibir a migração leucocitária para a cavidade pleural ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $8,12 \pm 1,00$; 2 mg/kg: $5,70 \pm 0,44$) ($P < 0,05$) (Figura 34). Esta inibição se deu às custas de mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $5,32 \pm 0,41$; 2 mg/kg: $3,12 \pm 0,31$) ($P < 0,05$) (Figura 34 *inset*). Além disso, observamos que este fármaco (0,5, 1 e 5 mg/kg, i.p., 0,5 h antes), também foi capaz de inibir os mononucleares, mas não os leucócitos na pleurisia induzida pela carragenina 48 h ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $5,32 \pm 0,41$; 0,5 mg/kg: $2,61 \pm 0,33$; 1 mg/kg: $1,56 \pm 0,21$ e 5 mg/kg: $3,12 \pm 0,57$) ($P < 0,05$) (Figura 34 e 34 *inset*).

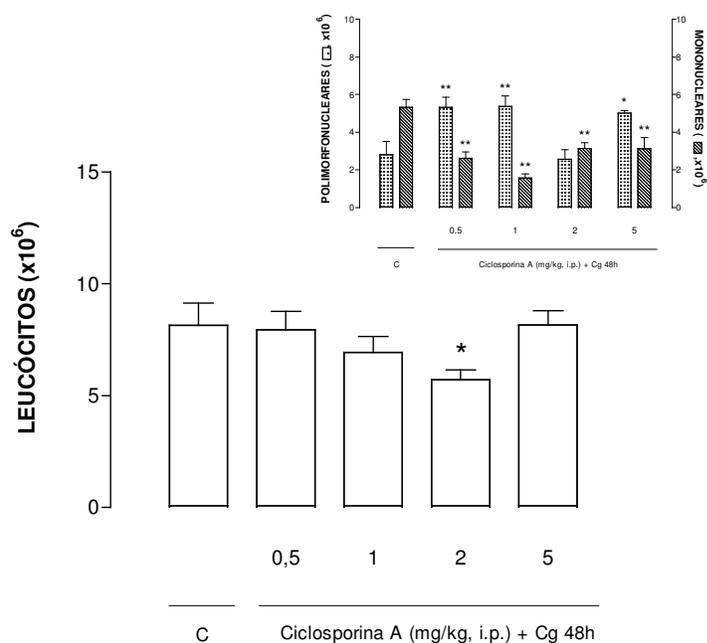
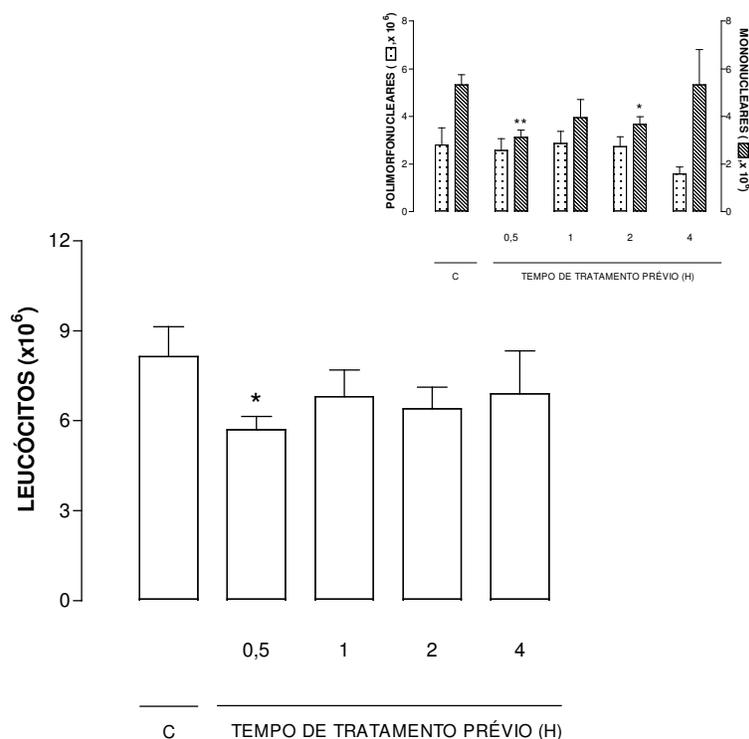


Figura 34 – Efeito da ciclosporina A, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito da ciclosporina A (0,1 - 5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural. Inset, Efeito desta droga sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Ao analisarmos o perfil temporal a ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), observamos que esta foi capaz de inibir a migração leucocitária para a cavidade pleural apenas quando administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $8,12 \pm 1,00$; CsA 0,5 h: $5,70 \pm 0,44$) ($P < 0,05$) (Figura 35). Esta inibição ocorreu às custas de mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $5,32 \pm 0,41$; CsA 0,5 h: $3,12 \pm 0,31$) ($P < 0,05$) (Figura 35 *inset*). Além disso, nas mesmas condições experimentais, a CsA administrada 2 h antes da Cg também inibiu significativamente os mononucleares, mas não os leucócitos totais ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $5,32 \pm 0,41$; CsA 2 h: $3,66 \pm 0,31$) ($P < 0,05$) (Figura 35



inset).

Figura 35 - Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 - 4 h antes da administração da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural. Inset, Efeito deste fármaco sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

5.10 Efeito da ciclosporina A sobre a contagem de macrófagos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

Para avaliação deste parâmetro inflamatório, utilizou-se apenas os grupos de animais com pleurisia 48 h, devido aos macrófagos participarem principalmente da resposta imune adaptativa 48 h após administração do agente flogístico. Neste experimento observamos uma diminuição significativa dos leucócitos totais (% de inibição: 29,8%), bem como de mononucleares (% de inibição: 41,3%) e de macrófagos (% de inibição: 84,1%) na cavidade pleural de animais com pleurisia ($P < 0,01$) (Figura 36).

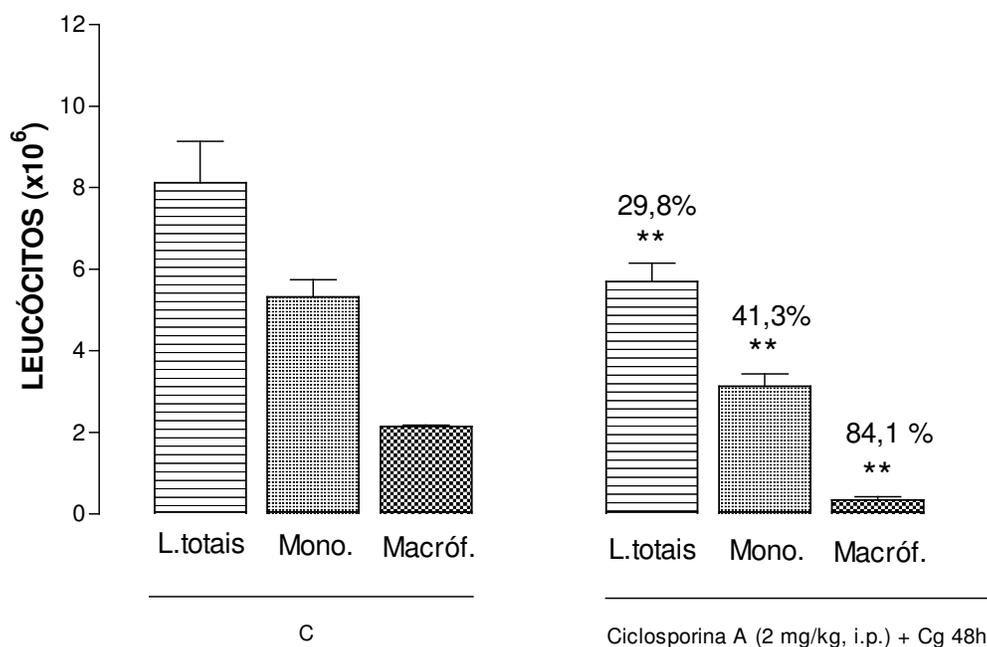


Figura 36 - Efeito da ciclosporina A na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos totais (L. totais), mononucleares (Mono.) e macrófagos (Macróf.) na cavidade pleural. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Os valores descritos acima das barras referem-se a percentagem de inibição, em relação ao grupo controle. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** $P < 0,01$.

5.11 Efeito da ciclosporina A sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia

A ciclosporina A, na dose de 1 mg/kg, i.p., administrada 1 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina, diminuiu significativamente o número total de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $8,30 \pm 0,46$; CsA: $4,32 \pm 1,18$) ($P < 0,01$) (Figura 37), e esta inibição se deu às custas da inibição de mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 4 h: $7,62 \pm 0,63$; CsA: $3,12 \pm 0,94$) ($P < 0,01$) (Figura 37 *inset*).

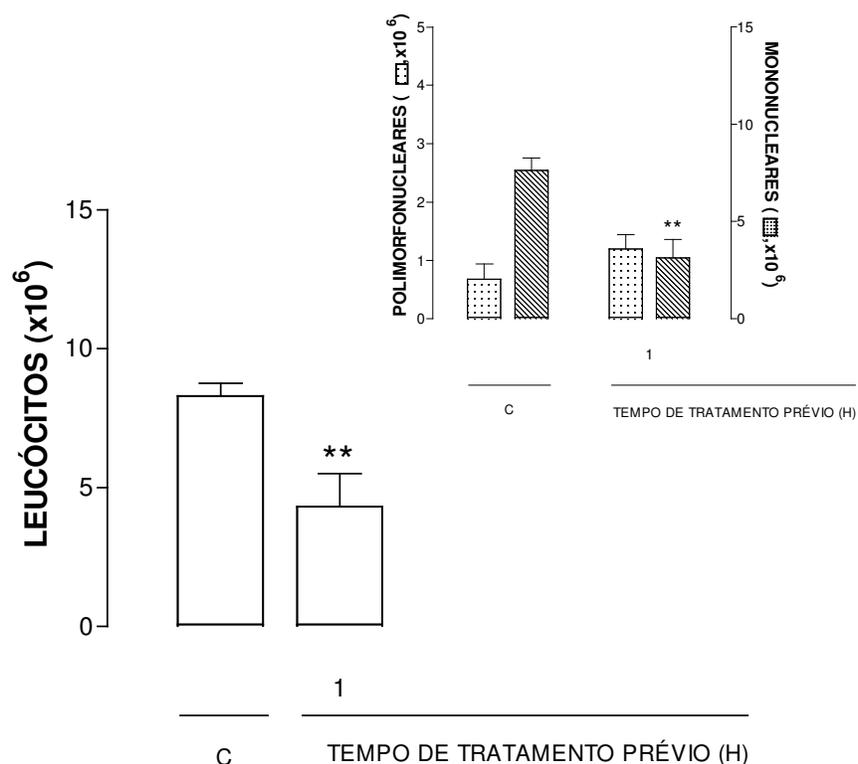
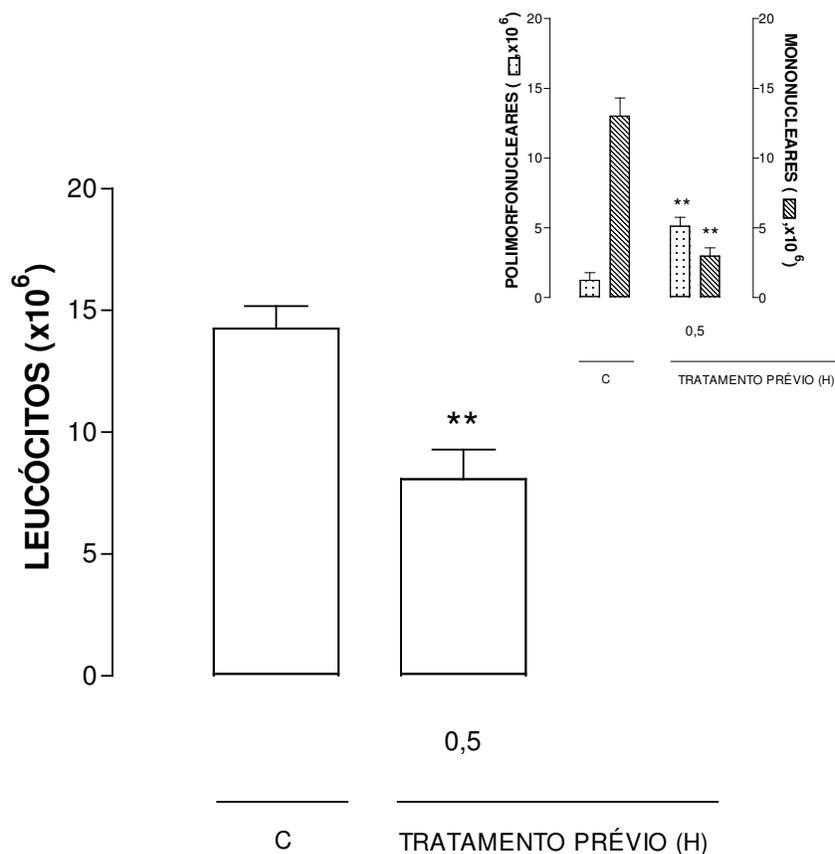


Figura 37 - Efeito da ciclosporina A na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes, sobre os níveis de leucócitos no sangue. Inset, efeito da ciclosporina A, sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares no sangue. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** $P < 0,01$.

Quando observamos o efeito da CsA na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, verificamos que este fármaco, administrado na dose de 2 mg/kg i.p., 0,5 h, foi capaz também de diminuir o número total de leucócitos no sangue ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $14,24 \pm 0,93$; CsA 0,5 h: $8,06 \pm 1,21$) ($P < 0,01$) (Figura 38), e esta diminuição se deu também às custas de mononucleares ($\times 10^6$) (Cg 48 h: $13,00 \pm 1,30$; CsA 0,5 h: $2,96 \pm 0,61$) ($P <$



0,01) (Figura 38 *inset*).

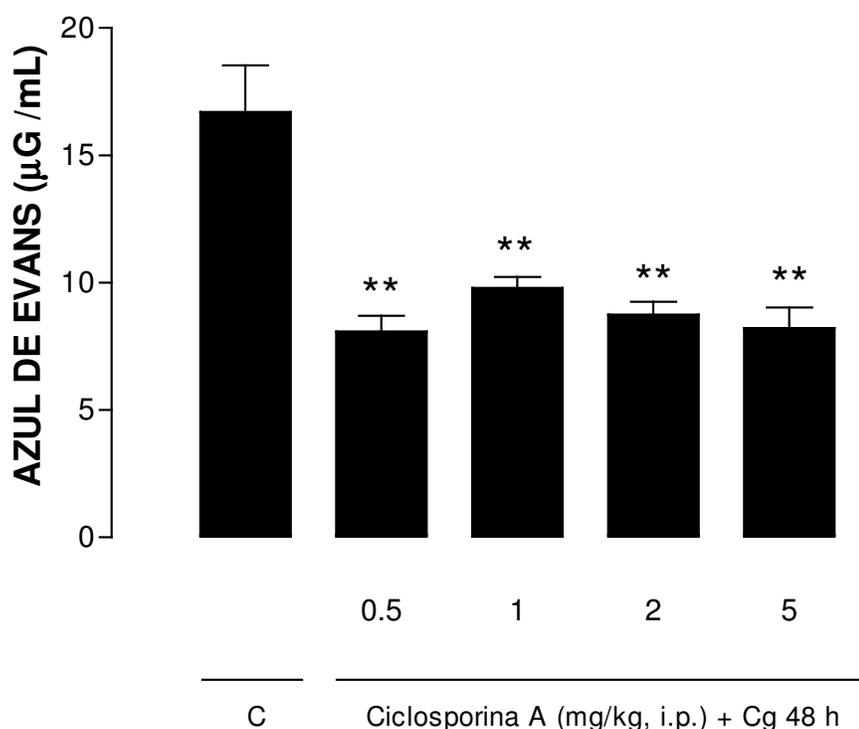
Figura 38 - Efeito da ciclosporina A na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.). Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes, sobre os níveis de leucócitos no sangue, Inset, efeito da ciclosporina A, sobre os níveis de polimorfonucleares e mononucleares no sangue. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** $P < 0,01$.

5.12 Efeito da ciclosporina A sobre a exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia

A ciclosporina A nas doses de 0,1 a 20 mg/kg, 0,5 h antes da indução da pleurisia, não foi capaz de inibir os níveis de exsudação na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina ($P > 0,05$) (Resultados não mostrados). Já na segunda fase (48 h) desta resposta inflamatória, observamos que a administração deste fármaco nas doses de 0,5, 1, 2 e 5 mg/kg, i.p., foi capaz de inibir a exsudação na cavidade pleural de camundongos ($\mu\text{g/mL}$) (Cg 48 h: $16,69 \pm 1,84$; 0,5 mg/kg: $8,07 \pm 0,63$; 1 mg/kg: $9,79 \pm 0,43$; 2 mg/kg: $8,74 \pm 0,50$ e 5 mg/kg: $8,21 \pm 0,81$) ($P < 0,01$) (Figura 39).

Figura 39 - Efeito da Ciclosporina A (0,5 - 5 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 antes da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito da ciclosporina A (0,5 - 5 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de exsudação. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** $P < 0,01$.

Avaliando o perfil temporal deste fármaco, observamos que na segunda



fase (48 h) da pleurisia, a ciclosporina A na dose de 2 mg/kg, i.p., (0,5, 1, 2 e 4 h) antes da administração da carragenina 48 h, inibiu significativamente os níveis de exsudação ($\mu\text{g/mL}$) (Cg 48 h: $16,70 \pm 1,84$; 0,5 h: $8,74 \pm 0,50$; 1 h: $10,25 \pm 0,90$; 2 h: $5,99 \pm 1,20$ e 4 h: $7,21 \pm 0,89$) ($P < 0,01$) (Figura 40).

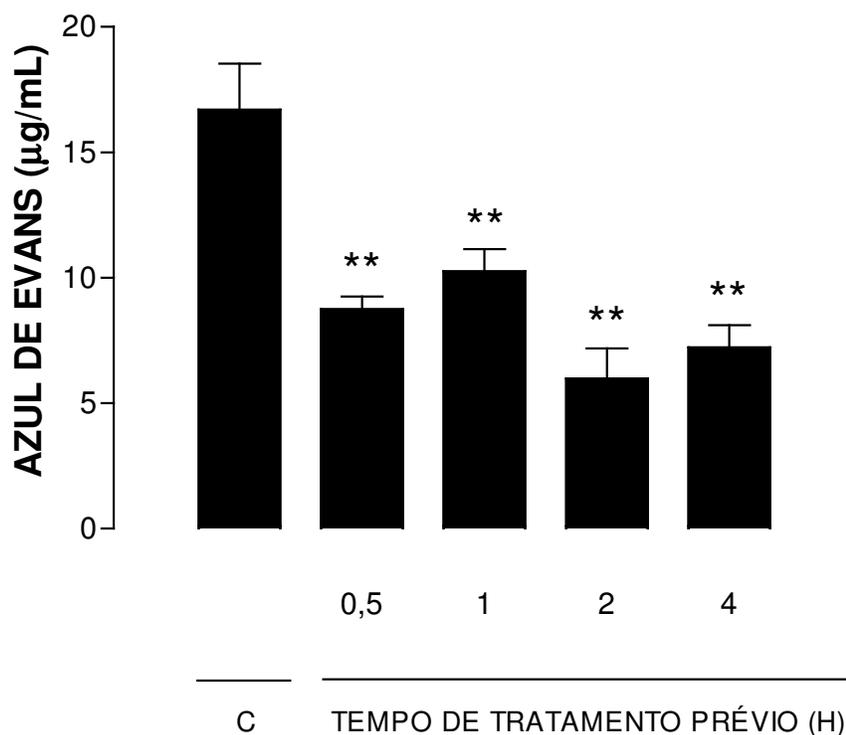


Figura 40 - Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada de 0,5 a 4 h antes da administração da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de exsudação. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** P < 0,01.

5.13 Efeito da ciclosporina A sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, baço, rins, fígado e coração) de camundongos com pleurisia

Para a avaliação deste parâmetro inflamatório, utilizou-se apenas os grupos de animais com pleurisia 48 h, devido a estes grupos terem apresentado inibição dos níveis de azul de evans no lavado pleural de camundongos com pleurisia, em experimentos anteriores. Além disso, foi utilizado o tempo de tratamento prévio de 0,5 h, da indução da pleurisia 48 h, devido a ser o melhor tempo de tratamento observado.

A ciclosporina A, administrada na dose de 2 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da pleurisia 48 h, inibiu apenas a exsudação nos pulmões ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) (Cg 48 h: $10,09 \pm 1,06$; CsA: $7,03 \pm 0,98$) ($P < 0,05$) (Figura 41).

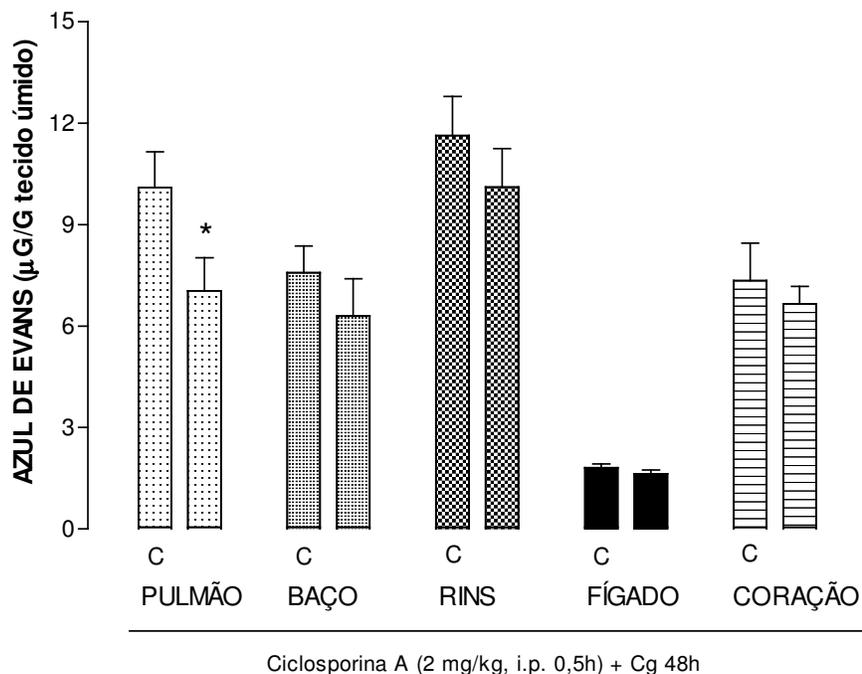


Figura 41 - Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 da administração da carragenina, na segunda (48 h) fase da pleurisia em camundongos. Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.) sobre a permeabilidade vascular em tecidos. C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. * $P < 0,05$.

5.14 Efeito da ciclosporina A sobre as concentrações da mieloperoxidase, adenosina-deaminase e nitrato/nitrito no lavado pleural de camundongos com pleurisia

Na primeira fase (4 h) da pleurisia a ciclosporina A (1 mg/kg, i.p., 1 h antes da carragenina), inibiu significativamente as concentrações de MPO (mM/mL) (Cg 4 h: $631,15 \pm 42,8$; CsA 1 h: $90,50 \pm 21,6$) ($P < 0,01$) (Figura 42). Avaliando o mesmo parâmetro na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória, observamos que a ciclosporina A 2 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da administração da carragenina, não foi capaz de diminuir as concentrações da mieloperoxidase no lavado pleural (Resultados não mostrados).

Quando avaliamos a atividade da ciclosporina A sobre níveis de adenosina-deaminase neste modelo experimental, podemos observar que este fármaco quando administrado na concentração de 1 mg/kg, i.p., 1 h antes da carragenina, não inibiu este parâmetro nem na primeira (4 h), nem na segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina (Resultados não mostrados).

Na avaliação dos níveis de nitrato/nitrito, utilizou-se também doses e tempos-resposta já determinados previamente em experimentos anteriores. A ciclosporina A quando administrada por via (i.p.) na dose de 1 mg/kg, 1 h antes da carragenina 4 h, diminuiu significativamente os níveis de nitrito/nitrato (NOx) (μM) (Cg 4 h: $22,41 \pm 2,0$; CsA 1 h: $2,99 \pm 0,1$) ($P < 0,01$) (Figura 43A). Na avaliação da segunda fase (48 h) da pleurisia, a ciclosporina A na dose de 2 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da carragenina, também diminuiu significativamente este parâmetro (NOx) (μM) (Cg 48 h: $10,64 \pm 1,1$; CsA 0,5 h: $5,66 \pm 1,20$) ($P < 0,01$) (Figura 43B).

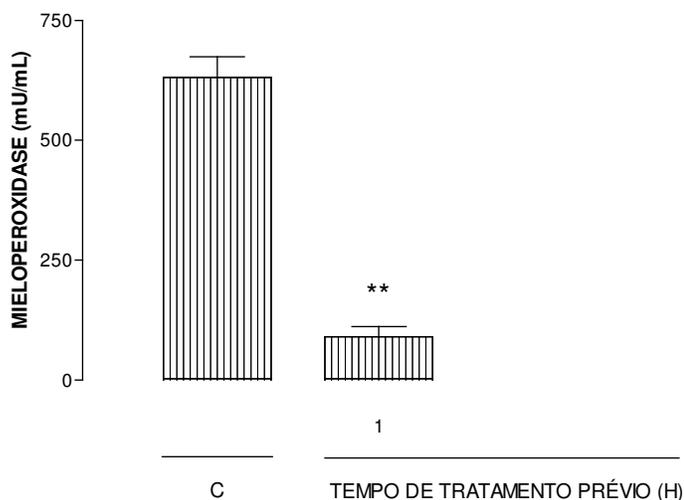


Figura 42 - Efeito da Ciclosporina A, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina 4 h, sobre os níveis da mieloperoxidase na cavidade pleural. C = Animais

controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o SEM. ** P < 0.01.

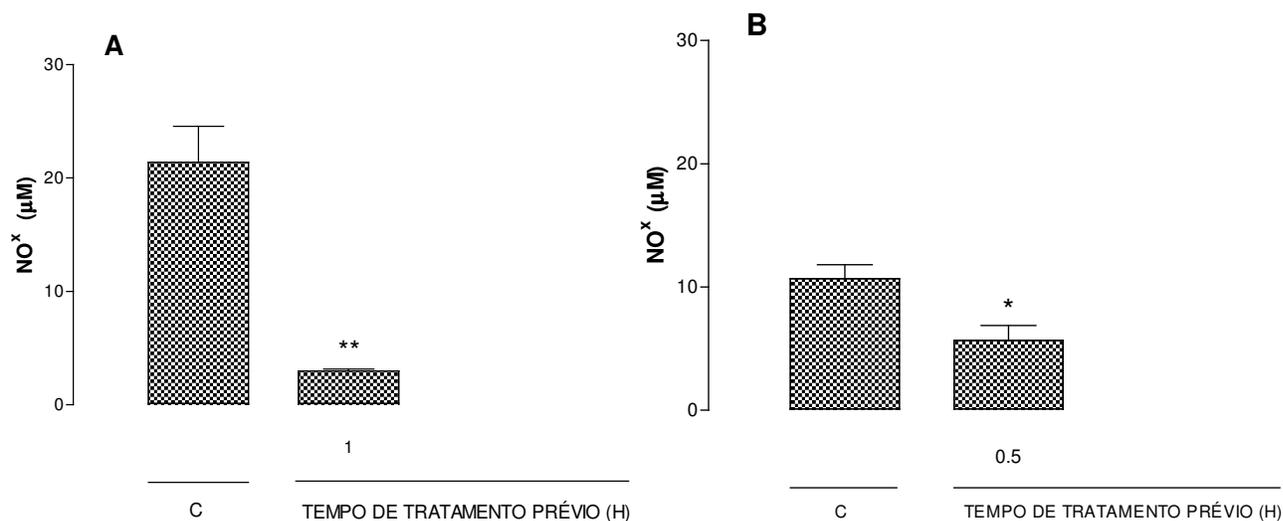


Figura 43 - Efeito da Ciclosporina A, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A - Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina 4 h, sobre os níveis de nitrato / nitrito (NOx) na cavidade pleural. B - Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina 48 h, sobre os níveis de nitrato / nitrito na cavidade pleural C = Animais controle, tratados apenas com Cg. Cada grupo representa uma média de 6 a 10 animais e a barra vertical o SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01.

5.15 Efeito da Ciclosporina A sobre a organização celular nos órgãos (pulmão, fígado, baço, coração e rins) de camundongos com pleurisia

A pesquisa do infiltrado celular em tecidos foi realizada por meio de técnicas histológicas, observando-se o tipo de leucócitos no pulmão, fígado, baço, coração e rins, além do grau de alteração morfológica celular tecidual em animais tratados com a ciclosporina A, antes da indução da pleurisia pela carragenina. As figuras enumeradas (A) representam a análise histológica de tecidos (pulmão, baço, fígado, coração e rins) de camundongos tratados somente com solução salina estéril (NaCl 0,9 %).

Na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina a ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes, promoveu uma diminuição significativa na congestão celular nos pulmões de camundongos com pleurisia

(de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), além de uma diminuição do número de polimorfonucleares (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figura 44C). E estes resultados foram comparados com o grupo controle (Figura 44B).

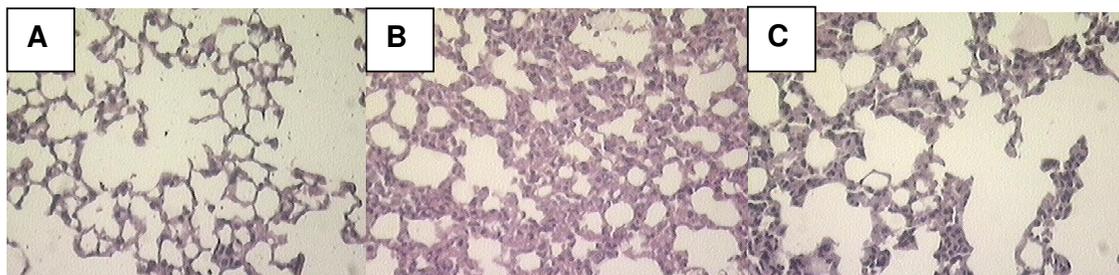


Figura 44 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de pulmões de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina (1%). Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular nos pulmões.

Na segunda (48 h) fase desta inflamação a ciclosporina A, foi capaz de diminuir significativamente a infiltração de polimorfonucleares e de mononucleares para os alvéolos pulmonares (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), além de diminuir consideravelmente a congestão tecidual observada no grupo controle (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figura 45C). E estes resultados foram comparados com o grupo controle (Figura 45B).

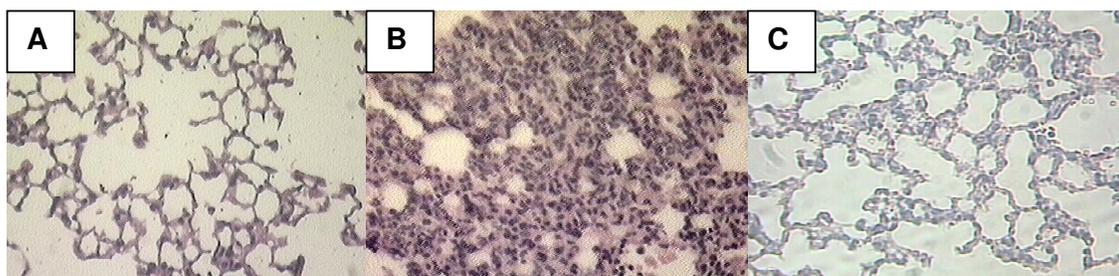


Figura 45 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de pulmões de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril.

B – Camundongos tratados com carragenina (1%). Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular nos pulmões.

Quando avaliamos o efeito deste mesmo fármaco sobre a organização celular no fígado, evidenciamos o desaparecimento da degeneração hidrópica (de grau 2: moderado, para grau 0: ausente) ($P < 0,01$), diminuição da discariose celular (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), além da diminuição na infiltração de polimorfonucleares e de mononucleares (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figura 46C), quando comparados ao grupo controle (Figura 46B).



Figura 46 – Análise comparativa de cortes histopatológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina (1%). Efeito do ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e organização celular no fígado.

Na avaliação do fígado na segunda (48 h) fase da pleurisia, observamos que o tratamento com ciclosporina A, na dose de 2 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da inflamação promoveu uma diminuição significativa na degeneração hidrópica (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), diminuição da discariose nuclear (de grau 2 : moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$), diminuição dos focos de necrose (de grau 3: abundante, para grau 1: discreto)

($P < 0,01$) e desaparecimento dos focos inflamatórios (de grau 3: abundante, para grau 0: ausente) ($P < 0,01$) (Figura 47C) observados no grupo controle (Figura 47B).

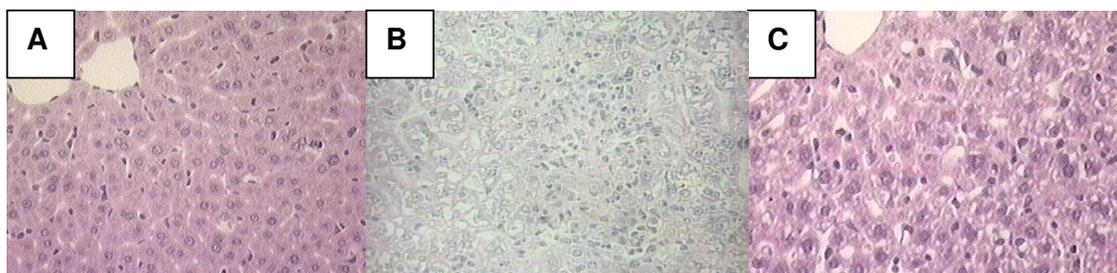


Figura 47 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina. B – Camundongos tratados com Cg 1%/cav. C- Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina 48 h, sobre a infiltração e organização celular no fígado.

A seguir avaliamos a organização celular no baço, dos animais tratados com ciclosporina A na dose de 1 mg/kg, i.p. 1 h antes da indução da pleurisia, e podemos observar que houve uma diminuição significativa da hiperplasia na polpa branca (de grau 1: discreto, para grau 0: ausente) ($P < 0,01$), da esplenite com diminuição no número de leucócitos do tipo polimorfonucleares observados na polpa vermelha (de grau 2: moderado, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) (Figura 48C), em relação ao grupo controle (Figura 48B).

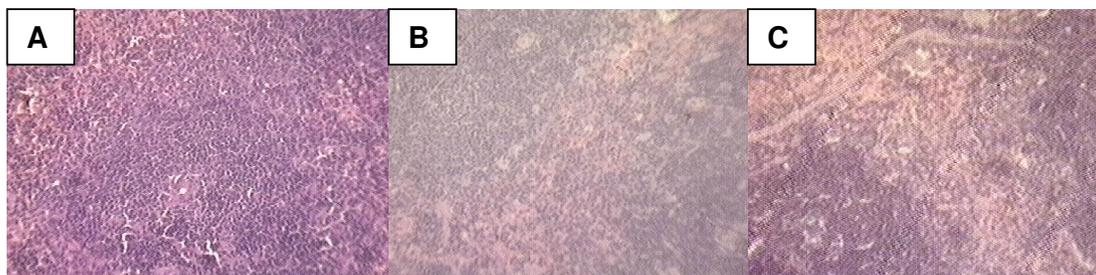


Figura 48 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina. B – Camundongos tratados com Cg 1%/cav. C- Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina 4 h, sobre a infiltração e organização celular no baço.

Na segunda (48 h) fase da pleurisia, a ciclosporina A na dose de 2 mg/kg, i.p. administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia, foi capaz de diminuir de forma significativa a esplenite, bem como o número de mononucleares (grau 3: abundante, para grau 1: discreto) ($P < 0,01$) na polpa vermelha e causar o desaparecimento dos centros germinativos da polpa branca no baço (de grau 3: abundante, para grau 0: ausente) ($P < 0,01$) (Figura 49C), quando comparados ao grupo controle (Figura 49B).

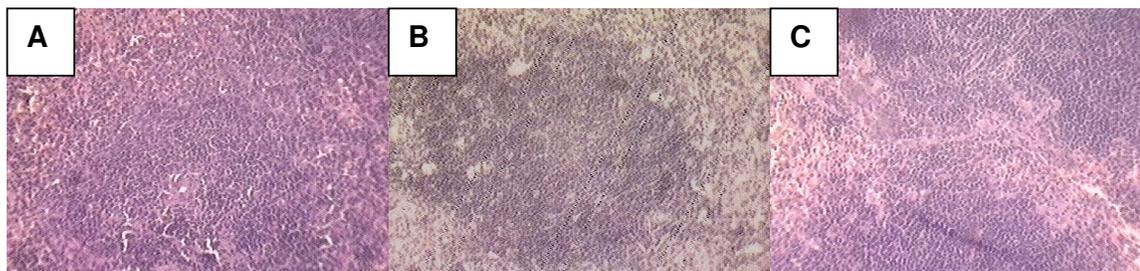


Figura 49 – Análise comparativa de cortes histopatológicos de baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina. B – Camundongos tratados com Cg 1%/cav. C- Efeito da Ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina 48 h, sobre a infiltração e organização celular no baço.

Nos outros órgãos estudados (coração e rins) não observou-se modificações significativas quanto a organização celular em nenhum dos experimentos realizados. (Resultados não mostrados).

5.16 Efeito da Ciclosporina A sobre a expressão de CD11a/CD18 em tecidos (pulmão e baço) de animais com pleurisia

As moléculas de adesão (CD11a e CD18) foram pesquisadas no pulmão e no baço de camundongos com pleurisia, por meio da técnica de imunohistoquímica utilizando-se para isso anticorpos monoclonais de rato anti-camundongos. As figuras identificadas como (A) revelam a análise imunohistoquímica dos tecidos de animais tratados somente com solução

salina estéril (NaCl 0,9%). As figuras (B) representam animais tratados com carragenina 1%/cav (4 e 48 h) e as figuras (C e D) camundongos tratados com a ciclosporina A, antes da pleurisia induzida pela carragenina 4 e 48 h.

Analisando os pulmões, a ciclosporina A na dose de 1 mg/kg, i.p. administrada 1 h, diminuiu significativamente a expressão de moléculas de adesão CD11a: de *score* 1, para *score* 0 ($P < 0,01$) (Figura 50C).

Avaliando o efeito deste fármaco na segunda (48 h) fase da pleurisia, sobre a expressão das moléculas de adesão do tipo CD11a, nos pulmões podemos observar que a ciclosporina A na dose de 2 mg/kg, i.p. diminuiu de forma significativa a expressão de moléculas de adesão CD11a, de *score* 4, para *score* 2 ($P < 0,01$) (Figura 51C).

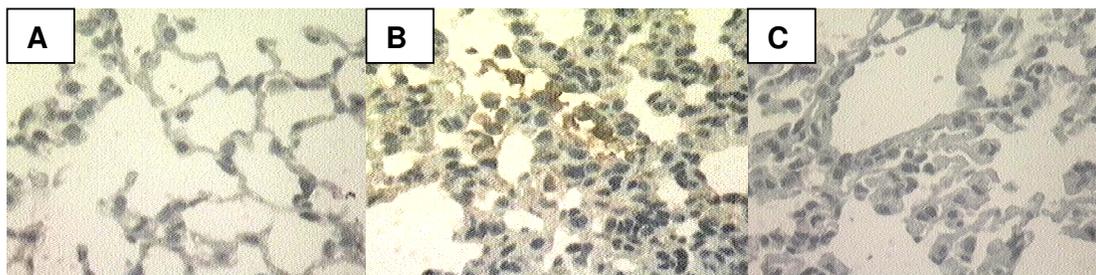


Figura 50 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD11a, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão tipo CD11a no pulmão (Aumento de 400 x).

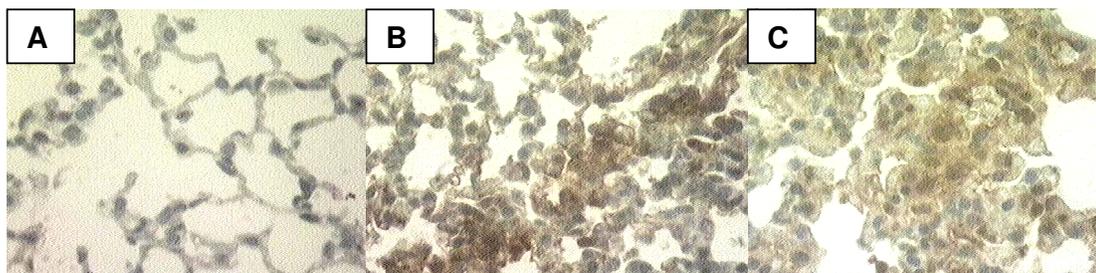


Figura 51 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de molécula de adesão CD11a, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com

carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão tipo CD11a no pulmão (Aumento de 400 x).

Avaliando-se o efeito da ciclosporina A, quando administrada na dose de 1 mg/kg, i.p. 0,5 h antes da carragenina 4 h, sobre a expressão de moléculas do tipo CD18, observamos uma redução significativa de *score* 2, para *score* 0 ($P < 0,01$) (Figura 52C).

Já na segunda (48 h) fase da pleurisia a ciclosporina A, aplicada na dose de 2 mg/kg, i.p., 0,5 h antes do agente flogístico, reduziu significativamente a expressão de moléculas de adesão CD18 de *score* 4, para *score* 3 ($P < 0,01$) (Figura 53C).

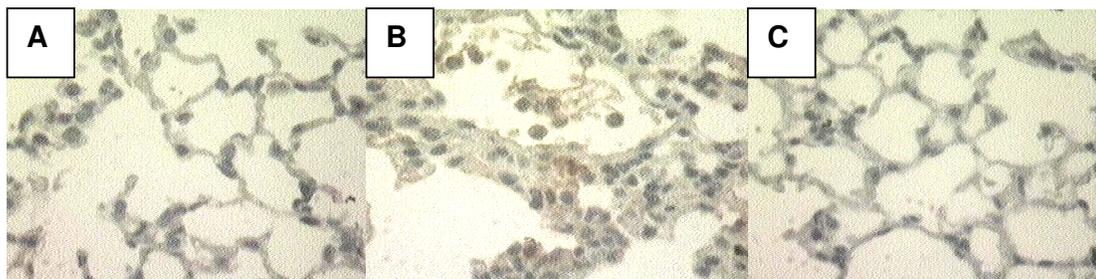


Figura 52 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da Ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no pulmão (Aumento de 400 x).

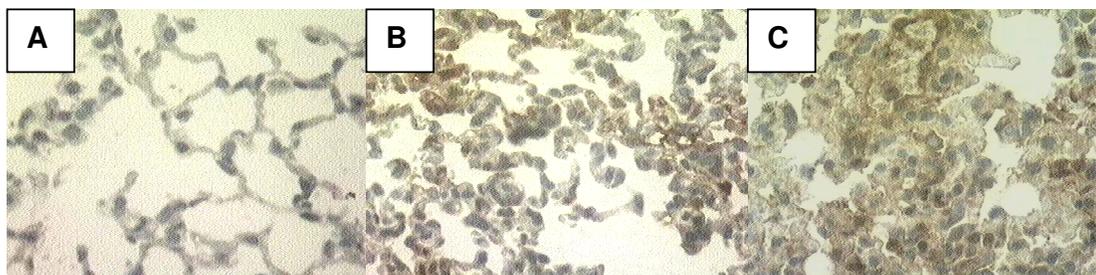


Figura 53 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a presença de moléculas de adesão CD18, no pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão CD18 no pulmão (Aumento de 400 x).

Analisando a expressão de moléculas de adesão do tipo CD11a no baço de camundongos, podemos observar que a ciclosporina A, na dose de 1 mg/kg, i.p. administrada 1 h antes, diminuiu a expressão destas moléculas de *score* 2, para *score* 0 ($P < 0,01$), na pleurisia induzida pela carragenina 4 h (Figura 54).

Já na segunda (48 h) fase da pleurisia, a ciclosporina A na dose de 2 mg/kg, i.p. 0,5 h antes, não foi capaz de diminuir a expressão de moléculas de adesão do tipo CD11a no baço, *score* 2 ($P > 0,05$) (Figura 55).

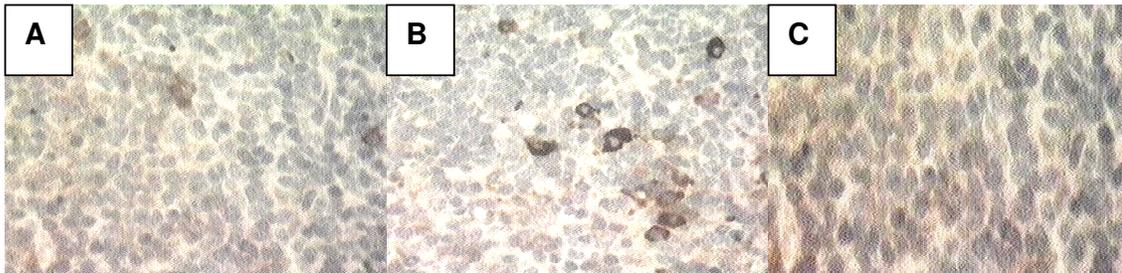


Figura 54 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD11a, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão tipo CD11a no baço. (Aumento de 400 x).

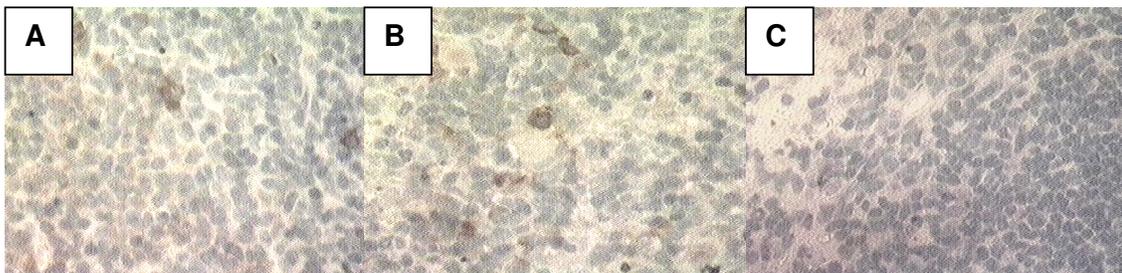


Figura 55 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão tipo CD11a, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão tipo CD11a no baço (Aumento de 400 x).

Avaliando, as moléculas de adesão do tipo CD18 no baço, podemos evidenciar uma diminuição na sua expressão de *score* 4, para *score* 1 ($P < 0,01$), quando a ciclosporina A foi administrada na dose de 1 mg/kg, i.p. 1 h antes, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h (Figura 56C).

Já na segunda (48 h) fase da pleurisia, quando os animais foram tratados com ciclosporina A na dose de 2 mg/kg, i.p. 0,5 h antes, as moléculas do tipo CD18, foram reduzidas de forma significativa de *score* 4, para *score* 2 ($P < 0,01$) (Figura 57C).

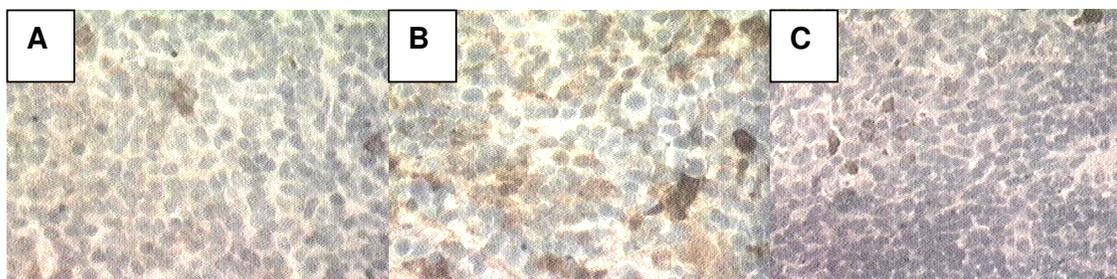


Figura 56 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (1 mg/kg, i.p.), administrada 1 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão tipo CD18 no baço (Aumento de 400 x).

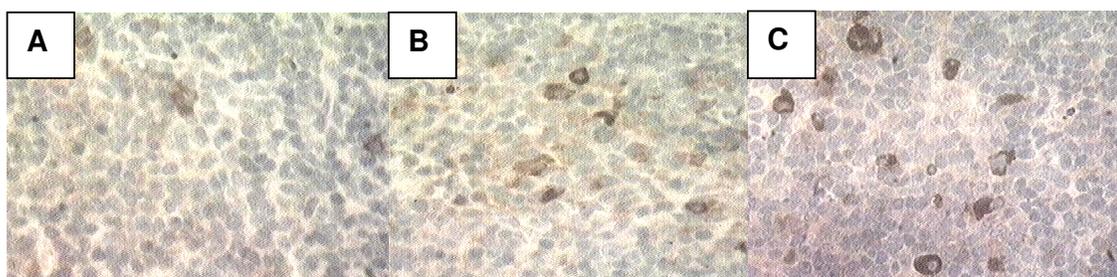


Figura 57 – Análise comparativa de cortes histológicos, revelando a expressão de moléculas de adesão CD18, no baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A – Camundongos tratados com solução salina estéril. B – Camundongos tratados com carragenina. C- Efeito da ciclosporina A (2 mg/kg, i.p.), administrada 0,5 h antes da carragenina, sobre a expressão de molécula de adesão tipo CD18 no baço (Aumento de 400 x).

6.DISSCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho contribuem significativamente para ampliar os conhecimentos acerca dos mecanismos relacionados à ação de fármacos imunossupressores, e o seu possível uso em processos inflamatórios, principalmente relacionados a doenças das vias aéreas. No caso específico, a utilização do metotrexato e da ciclosporina A no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Neste trabalho observou-se a participação de alguns mediadores inflamatórios (mieloperoxidase, adenosina-deaminase, óxido nítrico), além das moléculas de adesão na resposta bifásica (4 e 48 h) mediada pela carragenina na cavidade pleural de camundongos, bem como as possíveis implicações sistêmicas destes fármacos neste modelo experimental (migração leucocitária, permeabilidade vascular, exsudação e infiltração de leucócitos para os tecidos).

Na análise conjunta dos resultados obtidos com o metotrexato e a ciclosporina A, observamos que ambos os fármacos foram eficazes em inibir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, quando administrados sistemicamente na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (DALMARCO et al., 2002). Esta inibição, ocorreu às custas da migração de leucócitos do tipo polimorfonucleares, principais células a migrarem para a cavidade pleural na primeira (4 h) fase da resposta inflamatória neste modelo experimental (SALEH et al., 1999). É interessante ressaltar que este efeito inibitório sobre a migração celular para a cavidade pleural, na primeira (4 h) fase da inflamação não foi dose dependente, tanto no tratamento com metotrexato ou ciclosporina A.

Podemos evidenciar também uma diminuição significativa nas concentrações de mieloperoxidase, o que comprova que ambos os fármacos são eficazes em diminuir a ativação deste tipo celular no lavado pleural, já que a mieloperoxidase é uma enzima presente principalmente em leucócitos ativados do tipo polimorfonucleares (TANG et al., 1998; KAYAZAWA et al., 2002; GASSER et al., 2003; WALRAND et al., 2003). Estes resultados são corroborados por outros estudos, que também têm demonstrado o efeito de fármacos imunossupressores sobre a inibição da migração leucocitária em diversos modelos animais, como por exemplo na artrite induzida pelo colágeno, em ratos (OLIVER et al., 1995), no transplante cardíaco, em ratos (CIESIELSKI et al., 1998), na pneumonia induzida por *Escherichia coli*, em camundongos (WANG et al., 2002), além da reação de hipersensibilidade do tipo IV, induzida pela tuberculina, em cobaias (WINKELSTEIN, 1975). Estudos em humanos também demonstraram que o metotrexato inibiu a migração leucocitária para o tecido articular de pacientes com artrite reumatóide (O'CALLAGHAN et al., 1988; KRAAN et al., 2000). Além disso, este fármaco também inibiu a infiltração leucocitária, na leucemia linfoblástica aguda (DERVIEUX et al., 2002).

Já a ciclosporina A, parece também ser efetiva em inibir, *in vitro*, a quimiotaxia de leucócitos, a produção de ânion superóxido e as lisoenzimas de neutrófilos induzidas por agonistas do tipo FMLP (formil-metionil-leucil fenilalanina) (SPISANI et al., 2001). Este fármaco também inibiu, *in vitro*, a citocina M-CSF (fator estimulante de macrófagos) que promove a proliferação e a diferenciação de monócitos a macrófagos, estimulados por clones de células CD3 positivas (FRETIER et al., 2002),

bem como a infiltração de neutrófilos e de macrófagos, no modelo da bolsa de ar, induzida por *Streptococcus* do grupo A, em ratos (DIETERGERATZ et al., 1993). Em humanos, existem vários relatos do efeito inibitório deste fármaco sobre a migração celular, dentre eles podemos destacar: diminuição na migração de eosinófilos para os pulmões de pacientes asmáticos (TSAI et al., 1994), diminuição na migração de neutrófilos para a conjuntiva, em pacientes com oftalmite fibrótica (LEONARDI et al., 2001), além de aumentar a sobrevida de pacientes submetidos a transplantes de órgãos, por meio da diminuição na migração de células inflamatórias para os tecidos transplantados, como os rins (OBERBAUER et al., 2003) e o pâncreas (KNIGHT et al., 2003).

Neste contexto, é importante comentar sobre a relação direta entre a migração leucocitária e a expressão de moléculas de adesão. Neste contexto, sabe-se que durante o processo inflamatório, os leucócitos são recrutados para o sítio da lesão por substâncias chamadas de quemocinas, mas para que estas células migrem dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado, além da vasoconstrição local, é necessária a participação de estruturas denominadas de moléculas de adesão (MACKAY e IMHOF, 1993; KULIDJIAN et al., 1999). O contato inicial entre os leucócitos e o endotélio vascular é mediado primeiramente pelas selectinas (E-, L- e P-, também conhecidas por CD62E, CD62L e CD62P) e seus receptores, que permitem que o leucócito percorra ao longo do endotélio vascular (COITO et al., 2002). A próxima etapa no processo de migração, é a adesão forte dos leucócitos no endotélio a qual é mediada principalmente pelas integrinas (DEDRICK et al., 2002). As principais integrinas envolvidas na migração e na fixação dos linfócitos T no tecido

inflamado, são o complexo LFA-1 (CD11a/CD18) e o VLA-4 (CD49d/CD29) e seus receptores (ICAM-1 e CD54), respectivamente (DEDRICK et al., 2002; ANDERSON e SIAHAAN, 2003).

Pesquisas em diversos modelos experimentais vêm demonstrando que o complexo CD11a/CD18, também denominado de LFA-1, uma integrina da classe $\beta 2$ é expressa em todos os leucócitos, e esta é importante para a migração celular para o sítio do processo inflamatório (KILGORE et al., 1998). Estas moléculas de adesão são denominadas de integrinas e fisiologicamente têm baixa afinidade pelo seu ligante. Após o estímulo induzido por citocinas pró-inflamatórias ou por ativação do fator de transcrição nuclear NF-kappa B, as moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais adquirem alta afinidade pelo seu ligante (TURUTIN et al., 2003). A partir deste evento e com a liberação também de fatores quimiotáticos, ocorre a ligação firme entre os leucócitos e o endotélio, permitindo, assim, a migração celular (HAN et al., 2001; TACHIMOTO et al., 2002). É importante ressaltar, ainda, que estudos em animais *knockout* ou transgênicos têm demonstrado a importância da expressão de moléculas de adesão em nível fisiológico (MIZGERD et al., 1997; JUNG et al., 1998; WALZOG et al., 1999). Além disso, estudos realizados em humanos com deficiência de CD18, constatou-se migração ineficiente de neutrófilos para o sítio do processo inflamatório, apesar do agente infeccioso (WILLEKE et al., 2001). Outros estudos realizados constataram que, de acordo com o órgão afetado ou o estímulo para induzir o processo inflamatório, a migração de neutrófilos para o sítio do processo inflamatório, pode ser dependente ou não da expressão do complexo CD11a/CD18 (QIN et al., 1996; FLAHERTY et al., 1997).

Sabendo-se da importância das moléculas de adesão, para a manutenção da resposta inflamatória, investigamos o efeito tanto do metotrexato como da ciclosporina A, na expressão das moléculas do tipo integrinas CD11a e CD18 principais moléculas responsáveis pela transmigração de leucócitos para os tecidos inflamados (DOUGLASS et al., 1998; ZHANG et al., 1998; MINE et al., 2002). No modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, constatou-se a expressão destas moléculas de adesão no pulmão, baço e fígado. E observamos que, ambos os fármacos estudados, diminuíram de forma significativa a infiltração de polimorfonucleares nos três órgãos analisados, e que esta inibição na migração de polimorfonucleares para os tecidos, ocorreu às custas da inibição das moléculas de adesão do tipo CD11a e CD18. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que estes efeitos também foram observados em outros modelos experimentais, *in vitro*, como por exemplo no modelo de adesão celular entre neutrófilos humanos, e a molécula de adesão ICAM-1 (LUM et al., 2002) e no modelo de lesão ulcerativa intestinal induzida pela indometacina, em ratos (STADNYK et al., 2002). Outro estudo importante, em humanos, tem demonstrado o efeito do metotrexato sobre a expressão de outras moléculas de adesão, dentre elas destacam-se a inibição de E-selectinas, ICAM-1 e VCAM-1, em pacientes com gengivite bolhosa (DAHLMAN-GHOZLAN et al., 2000).

Estes resultados demonstram, um importante efeito antiinflamatório sistêmico do metotrexato e da ciclosporina A, uma vez que observou-se inibição significativa na expressão da integrina LFA-1 e conseqüente diminuição na migração de polimorfonucleares para os tecidos inflamados na primeira (4 h) fase da inflamação induzida pela carragenina, em camundongos.

Analisando o efeito destes fármacos na segunda (48 h) fase deste processo inflamatório, podemos evidenciar diminuição significativa na migração de leucócitos do tipo mononucleares para os tecidos: pulmão, baço e fígado, além de diminuição significativa na migração de polimorfunucleares, para o pulmão e o fígado. Juntamente com estes resultados, não foi observada diminuição significativa na expressão de CD18 no pulmão, quando os animais foram tratados com o metotrexato, demonstrando que este fármaco na dose testada, não foi efetivo em inibir a expressão desta molécula de adesão (CD18) no pulmão, embora tenha diminuído a migração de leucócitos para o tecido inflamado na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória. O que nos leva a sugerir, que este fármaco, na dose testada foi ineficiente em inibir a ativação de fatores de transcrição nuclear que promovem a expressão de CD18 no pulmão, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Uma outra hipótese, seria o fato da molécula de adesão CD18, não apresentar papel central sobre a migração de leucócitos para o tecido pulmonar na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória induzida pela carragenina.

Quando analisamos o efeito destes dois fármacos no baço, podemos também evidenciar que o efeito antiinflamatório da ciclosporina A, não deveu-se a inibição da expressão da molécula de adesão (CD11a), pois a ciclosporina A não inibiu significativamente a expressão de CD11a neste órgão na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória induzida pela carragenina, embora tenha ocorrido diminuição na migração de mononucleares para o tecido inflamado. Apesar deste resultado, alguns trabalhos tem revelado o efeito inibitório do metotrexato e da ciclosporina

A, sobre a expressão de moléculas de adesão do tipo integrinas em outros modelos experimentais, como no modelo de transplante cardíaco, em ratos (CIESIELSKI et al., 1998), e em rim de ratos com doença sérica induzida por ovalbumina (RINCON et al., 2000). Em humanos, utilizando-se técnicas de imuno-histoquímica e citometria de fluxo, observou-se que estes fármacos foram eficazes em inibir moléculas de adesão do tipo CD43, VLA-4 e LFA-1 (CD11a/CD18), em pacientes com psoríase (TORRES-ALVAREZ, et al., 1998).

Outros estudos também tem sido realizados, no sentido de verificar o mecanismo de ação do efeito inibitório dos fármacos estudados, sobre a expressão de moléculas de adesão, dentre eles destacam-se: inibição de p38 MAPK e iNOS (RAFIEE et al., 2002), em células endoteliais do cordão umbilical de humanos (MARKOVIC et al., 2002) e inibição da expressão de ICAM-1 e quemocinas em células endoteliais de cérebro humano (ZHANG et al., 2000).

Com estes resultados podemos sugerir que a utilização de ambos os fármacos, como agentes antiinflamatórios é importante, uma vez que foram capazes de inibir a expressão de moléculas de adesão e que o recrutamento de leucócitos, principalmente de linfócitos T efetores para o sítio de inflamação pode contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias, incluído a asma humana (MARIANI e PANINA-BORDIGNON, 2003).

Se analisarmos o efeito dos fármacos estudados em relação a enzimas que participam da resposta inflamatória, devemos destacar primeiramente que, os mecanismos pelos quais os fármacos imunossupressores, inibem o processo inflamatório vem sendo estudado

em diversos modelos experimentais, em que a produção de óxido nítrico via óxido nítrico sintase (iNOS) induzida, tem sido caracterizado (HAYEM et al., 2000; HÄMÄLÄINEN et al., 2002). Em nosso estudo, observamos que ambos os fármacos (metotrexato e ciclosporina A) foram capazes de inibir significativamente as concentrações de óxido nítrico, importante mediador inflamatório liberado pela ação da óxido nítrico sintase (NOS) em diversos tipos celulares, incluindo os polimorfonucleares (MOLERO et al., 2002; TSUJI et al., 2002) e relacionado também a formação de edema. A hipótese para estes resultados é que o efeito antiinflamatório do metotrexato e da ciclosporina A, também pode ocorrer, em parte, por inibição na produção de óxido nítrico (TRAJKOVIC et al., 1999; DALMARCO et al., 2002). Por outro lado, diversos resultados observados na literatura, apontam para o fato que as concentrações de nitrato não estão necessariamente correlacionadas com os níveis de neutrófilos ou de mononucleares, indicando que nestes protocolos experimentais, o óxido nítrico provem de diferentes fontes celulares, além dos leucócitos (DI ROSA et al., 1996; BARNES et al., 1998). Além disso, estudos *in vitro*, utilizando macrófagos humanos da linhagem J774, induzidos por endotoxina revelam que os fármacos imunossupressores, são capazes de inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (HÄMÄLÄINEN et al., 2002). Nesses estudos a ciclosporina A, foi capaz de inibir a NOS induzida em células epiteliais de colo e em macrófagos humanos da linhagem J774 (HÄMÄLÄINEN et al., 2002). Estudos também demonstram que, o metotrexato inibiu a NOSi no sobrenadante de culturas de células epiteliais de pulmão (linhagem LA-4) de camundongos

estimulados com citomix (combinação de TNF- α , IL1 β e INF- λ) (ROBBINS et al., 1998).

Em relação a adenosina-deaminase, os efeitos do metotrexato sobre os níveis desta enzima também foi avaliada. Já foi demonstrado que este fármaco pode aumentar as concentrações intracelulares da enzima AICAR tranformilase necessária para a síntese de purinas (CRONSTEIN et al., 1993, 1994), o que resulta em um aumento na liberação da adenosina, considerado um poderoso autacóide antiinflamatório (CRONSTEIN et al., 1993, 1994). Estudo *in vitro*, demonstraram que a interação da adenosina com seus receptores tipo 2 inibe, entre outros, a expressão de moléculas de adesão do tipo CD11a/CD18, em neutrófilos humanos e em miócitos caninos (BULLOUGH et al., 1996). Para validar estes resultados, diversos estudos *in vitro*, têm demonstrado que a adenosina-deaminase é eficaz em inibir os efeitos da liberação da adenosina. No presente trabalho, o tratamento prévio dos animais com o metotrexato, promoveu redução no *pool* de mononucleares, em associação com diminuição significativa nas concentrações da ADA. De acordo com estes resultados, a hipótese de que a diminuição nas concentrações da ADA pode favorecer o efeito da adenosina liberada pelo metotrexato no sítio da inflamação, não pode ser descartada. Por outro lado, o fato que o metotrexato administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, aumenta os níveis de ADA 4 h mas não 24 h antes, indica que este fármaco realiza seu efeito antiinflamatório via outros mediadores envolvidos, além da adenosina (DALMARCO et al., 2002). Em relação à ciclosporina A, não foi observada nenhuma modificação significativa nos níveis da adenosina-deaminase,

em nenhuma das fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, demonstrando que os efeitos antiinflamatórios deste fármaco não são mediados pelo aumento nos níveis de adenosina (DALMARCO et al., 2002).

Ao estudarmos a exsudação, verificamos que estes fármacos diminuíram o edema na cavidade pleural de camundongos. Este parâmetro inflamatório é um dos mais observados nas reações inflamatórias (GREIFF et al., 1998; EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD et al., 1999) e este efeito é mediado, em parte, pelo aumento na liberação de bradicinina na primeira fase (4 h) e, de histamina, na primeira e segunda fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (GREIFF et al., 1998; EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD et al., 1999). Além disso, vários estudos em humanos, tem demonstrado a estreita relação entre as concentrações de histamina e os níveis de exsudação, na inflamação aguda das vias aéreas (CERVIN et al., 2002) e nas doenças atópicas das vias aéreas (GREIFF et al., 2002).

Analisando o efeito do metotrexato e da ciclosporina A, sobre a exsudação, na cavidade pleural e nos principais órgãos (pulmão, fígado, coração, rins e baço), observamos que ambos os fármacos não foram capazes de diminuir os níveis deste parâmetro, na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina. Possivelmente por não possuírem ação sobre mediadores inflamatórios liberados e/ou formados, responsáveis pela exsudação na primeira (4 h) fase da pleurisia (SALEH et al., 1998). Por outro lado, quando avaliamos este mesmo efeito na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória, observamos que ambos os fármacos foram eficazes em reduzir de forma significativa os níveis de

exsudação, na cavidade pleural, além de diminuir a exsudação nos pulmões, demonstrando mais uma vez o efeito anti-edematogênico dos fármacos na cavidade pleural e nos pulmões, na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória induzida pela carragenina.

Este efeito explica-se, provavelmente, devido à ação do metotrexato e da ciclosporina A sobre os mediadores liberados e/ou formados nesta fase (48 h) fase da resposta inflamatória, relacionados a exsudação e/ou aumento da permeabilidade vascular (GREIFF et al., 1998; EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD et al., 1999). Dentre estes mediadores, destacam-se: o leucotrieno D₄, a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 10 (IL-10), além do fator de agregação plaquetária (PAF) (FRÖDE et al., 2002). Estes resultados também coincidem com a literatura, uma vez que trabalhos mencionam que alguns imunossuppressores quando utilizados em baixas doses, não apresentam inibição significativa sobre a diminuição da exsudação, em fases agudas em modelos experimentais, como nos modelos da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (DALMARCO et al., 2002), da bolsa de ar induzida por *Streptococcus* do grupo A, em ratos (DIETER-GERATZ et al., 1993), de sensibilização das vias aéreas por isocianato de tolueno em cobaias (ERJEFALT e PERSSON, 1992).

Em conjunto, os resultados obtidos, demonstram que tanto o metotrexato como a ciclosporina A nas doses testadas, neste modelo experimental, promoveram importante efeito antiinflamatório, principalmente em nível celular, inibindo os leucócitos, bem como mediadores liberados por células. Além disso, o uso deste modelo experimental, pode ser útil para o estudo de fármacos com potencial antiinflamatório.

7. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados obtidos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos indicam que: o metotrexato e a cicloporina A, foram capazes de diminuir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina. Além disso, a ciclosporina A foi capaz de diminuir o número de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia induzida pela carragenina;
- 2) O metotrexato e a ciclosporina A, foram capazes de inibir significativamente a migração de macrófagos para a cavidade pleural na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina;
- 3) O metotrexato e a ciclosporina A, foram capazes de diminuir significativamente a formação de edema, apenas na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória induzida pela carragenina;
- 4) O metotrexato e a cicloporina A, foram capazes de diminuir significativamente a permeabilidade vascular nos pulmões, na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina;
- 5) O metotrexato foi capaz de diminuir significativamente os níveis de mieloperoxidase, óxido nítrico em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina. Enquanto a ciclosporina A, foi capaz de diminuir as concentrações de óxido nítrico em ambas (4 e 48 h) fases da pleurisia e a mieloperoxidase apenas na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela

- carragenina. Em relação as concentrações de adenosina-deaminase, apenas o metotrexato foi capaz de diminuir significativamente suas concentrações na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina;
- 6) O metotrexato e a ciclosporina A, foram capazes de inibir a migração de leucócitos para tecidos (pulmão, fígado e baço) em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina;
 - 7) O metotrexato e a ciclosporina A, foram capazes de inibir a expressão de moléculas de adesão do tipo CD11a nos pulmões em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, enquanto a expressão desta molécula de adesão no baço, foi inibida por ambos os fármacos na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, já na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, apenas o metotrexato foi capaz de inibir a expressão de CD11a;
 - 8) O metotrexato e a ciclosporina A, foram capazes de inibir a expressão de moléculas de adesão do tipo CD18 nos pulmões na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, enquanto na segunda (48 h) fase, apenas a ciclosporina A, foi capaz de inibir a expressão desta molécula de adesão. Em relação à expressão de CD18 no baço, o metotrexato e a ciclosporina A, foram capazes de inibir a expressão desta molécula de adesão em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos;
 - 9) Através do nosso trabalho podemos observar significantes efeitos antiinflamatórios, dos fármacos imunossupressores em processos inflamatórios

da cavidade pleural de camundongos, além disso a utilização do modelo da pleurisia induzida pela carragenina, que reconhecidamente é útil para o estudo de drogas com perfil antiinflamatório das vias aéreas, nos possibilitou concluir que futuramente estes fármacos poderão ser utilizados contra processos inflamatórios das vias aéreas.

- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.**, **357(3)**: 593-615, 2001.
- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R.C. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Med Clin North Am.**, **81(1)**: 1-28, 1997.
- ALTAVILLA, D.; SAITTA, A.; GUARINI, S.; GALEANO, M.; SQUADRITO, G.; SANTAMARIA, L.B.; VENUTI, F.S.; BAZZANI, C.; BERTOLINI, A.; SQUADRITO, F. Nuclear factor-kappaB as a target of cyclosporin in acute hypovolemic hemorrhagic shock. **Cardiovasc Res.**, **52(1)**: 143-152, 2001.
- ANDERSON, M.E.; SIAHAAN, T.J. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. **Peptides.**, **24(3)**: 487-501, 2003.
- ARIMOTO, T.; BING, G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. **Neurobiol Dis.**, **12(1)**: 35-45, 2003.
- AUBRY, J.P.; DUGAS, N.; LECOANET-HENCHOZ, S.; OUAZ, F.; ZHAO, H.; DELFRAISSY, J.F.; GRABER, P.; KOLB, J.P.; DUGAS, B.; BONNEFOY, J.Y.; The 25-kDa soluble CD23 activates type III constitutive nitric oxide-synthase activity via CD11b and CD11c expressed by human monocytes. **J Immunol.**, **159(2)**: 614-622, 1997.
- AVONTUUR, J.A.; BUIJK, S.L.; BRUINING, H.A. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. **Eur J Clin Pharmacol.**, **54(8)**: 627-631, 1998.
- BALTRONS, M.A.; PEDRAZA, C.; SARDON, T.; NAVARRA, M.; GARCIA, A. Regulation of NO-dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells. **Toxicol Lett.**, **139(2-3)**: 191-198, 2003.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.**, **336(15)**: 1066-1071, 1997.
- BARNES, P.J.; CHUNG, K.F.; PAGE, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol Rev.**, **50(4)**: 515-596, 1998.
- BERNAREGGI, M.; MITCHELL, J.A.; BARNES, P.J.; BELVISI, M.G. Dual action of nitric oxide on airway plasma leakage. **Am J Respir Crit Care Med.**, **155(3)**: 869-874, 1997.
- BIASI, D.; CARLETTO, A.; CARAMASCHI, P.; BONELLA, F.; BAMBARA, V.; PACOR, M.L.; BAMBARA, L.M. Neutrophils in rheumatoid inflammation. **Recenti Prog Med** **94(1)**: 25-30, 2003.
- BLACKBURN, M.R.; DATTA, S.K.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy

- exhibit a combined immunodeficiency. **J Biol Chem.**, **273(9)**: 5093-5100, 1998.
- BLACKBURN, M.R. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. **Trends Pharmacol Sci.**, **24(2)**: 66-70, 2003.
- BOREL, J.F. The history of cyclosporin A and its significance. In: CYCLOSPORIN A. Amsterdam, 1982. p. 5-17.
- BOXER, L.A. Distúrbios da função dos neutrófilos. In: CECIL TRATADO DE MEDICINA INTERNA. Rio de Janeiro, 1997. p. 1101-1103.
- BUDZIK, G.P.; COLLETTI, L.M.; FALTYNEK, C.R. Effects of methotrexate on nucleotide pools in normal human T cells and the CEM T cell line. **Life Sci.**, **66(23)**: 2297-2307, 2000.
- BULLOUGH, D.A.; MAGILL, M.J; MULLANE, K.M; FIRESTEIN, G.S. Carbohydrate- and CD18-dependent neutrophil adhesion to cardiac myocytes: effects of adenosine. **Cardiovasc Res.**, **32(2)**: 328-334, 1996.
- BUSSE, W.W.; LEMANSKE, R.F. Jr. Asthma. **N Engl J Med.**, **344(5)**: 350-362, 2001.
- CALLARD, R.; GEORGE, A.J.; STARK, J. Cytokines, chaos, and complexity. **Immunity.**, **11(5)**: 507-513, 1999.
- CASCIERI, M.A.; SPRINGER, M.S. The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention. **Curr Opin Chem Biol.**, **4(4)**: 420-427, 2000.
- CERVIN, A.; GREIFF, L.; LINDBERG, S.; ANDERSSON, M. Acute exudative inflammation and nasally exhaled nitric oxide are two independent phenomena. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.**, **64(1)**: 26-31, 2002.
- CHA, M.S.; LEE, M.J.; JE, G.H.; KWAK, J.Y. Endogenous production of nitric oxide by vascular endothelial growth factor down-regulates proliferation of choriocarcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, **282(4)**: 1061-1066, 2001.
- CHAKRABORTI, S. Phospholipase A2 isoforms: a perspective. **Cellular Signalling.**, **15(7)**: 637-665, 2003.
- CHIZZOLINI, C.; REZZONICO, R.; DE LUCA, C.; BURGER, D.; DAYER, J.M. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by

- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. **J Immunol.**, **164(11)**: 5952-5960, 2000.
- CHULADA, P.C.; ARBES, S.J. JR; DUNSON, D.; ZELDIN, D.C. Breast-feeding and the prevalence of asthma and wheeze in children: analyses from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Allergy Clin Immunol.**, **111(2)**: 328-36, 2003.
- CIESIELSKI, C.J.; MEI, J.; PICCININI, L.A. Effects of cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. **Transpl Immunol.**, **6(2)**: 122-33, 1998.
- CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation?. **Trends Pharmacol Sci.**, **24(2)**: 91-95, 2003.
- CLAIR, S. Nitric oxide-friend or foe in arthritis?. **J Rheumatol.**, **25(8)**: 1451-1453, 1998.
- COITO, A.J.; SHAW, G.D.; MENG, L.; MOORE, C.; MA, J.; BUSUTTIL, R.W.; KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. CD62-PSGL-1 interactions regulate cytokine chemokine and apoptotic networks in cardiac allograft recipients. **Transplant Proc.**, **34(5)**: 1463-1464, 2002.
- COLLAZOS, J.; ESPANA, P.; MAYO, J.; MARTINEZ, E.; IZQUIERDO, F. Sequential evaluation of serum adenosine deaminase in patients treated for tuberculosis. **Chest.**, **114(2)**: 432-435, 1998.
- COMBARROS, O.; SANCHEZ-GUERRA, M.; INFANTE, J.; LLORCA, J.; BERCIANO, J. Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease. **J Neurol.**, **249(9)**: 1242-1245, 2002.
- CONE, J.B. Inflammation. **The American Journal of Surgery.**, **182(6)**: 558-562, 2001.
- CONSTANTIN, A.; LOUBET-LESCOULIE, P.; LAMBERT, N.; YASSINE-DIAB, B.; ABBAL, M.; MAZIERES, B.; DE PREVAL, C.; CANTAGREL, A. Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Arthritis Rheum.**, **41(1)**: 48-57, 1998.
- CRONSTEIN, B.N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes

- leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. **J Clin Invest.**, **92(6)**: 2675-2682, 1993.
- CRONSTEIN, B.N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. **Adv Exp Med Biol.**, **370(1)**: 411-416, 1994.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F.A.; CAPUTI, A.P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Am J Respir Crit Care Med.**, **162(5)**: 1859-1866, 2000.
- DAHLMAN-GHOZLAN, K.; HEILBORN, J.D.; STEPHANSSON, E. Circulating levels of soluble E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in bullous pemphigoid during low-dose methotrexate therapy. A prospective study. **Exp Dermatol.**, **9(5)**: 336-340, 2000.
- DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm.**, **11(5)**: 299-306, 2002.
- DE BRITO, F.D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: PHARMACOLOGICAL METHODS IN THE CONTROL OF INFLAMMATION. Dagenham, 1989. p. 173-228.
- DI ROSA, M.; IALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTEBIN, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, **54(4)**: 229-238, 1996.
- DEDRICK, R.L.; WALICKE, P.; GAROVOY, M. Anti-adhesion antibodies efalizumab, a humanized anti-CD11a monoclonal antibody. **Transpl Immunol.**, **9(2-4)**: 181-186, 2002.
- DERVIEUX, T.; BRENNER, T.L.; HON, Y.Y.; ZHOU, Y.; HANCOCK, M.L.; SANDLUND, J.T.; RIVERA, G.K.; RIBEIRO, R.C.; BOYETT, J.M.; PUI, C.H.; RELLING, M.V.; EVANS, W.E. De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurine alone or in combination with methotrexate in vivo. **Blood.**, **100(4)**: 1240-1247, 2002.
- DIETER-GERATZ, J.; PRYZWANSKY, K.B.; SCHWAB, J.H.; ANDERLE, S.K.; TIDWELL, R.R. Suppression of local and systemic responses in streptococcal cell wall-induced acute inflammation of the air pouch by cyclosporine A. Comparison with the effects of two anti-inflammatory bis-benzimidazoles. **Am J Pathol.**, **142(4)**: 1227-1237, 1993.
- DJUPESLAND, P.G.; CHATKIN, J.M.; QIAN, W.; HAIGHT, J.S. Nitric oxide in the nasal airway: a new dimension in otorhinolaryngology. **Am J Otolaryngol.**, **22(1)**: 19-32, 2001.

- DOUGLASS, W.A.; HYLAND, R.H.; BUCKLEY, C.D.; AL-SHAMKHANI, A.; SHAW, J.M.; SCARTH, S.L.; SIMMONS, D.L.; LAW, S.K. The role of the cysteine-rich region of the beta2 integrin subunit in the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, alphaLbeta2, CD11a/CD18) heterodimer formation and ligand binding. **FEBS Lett.**, **440(3)**: 414-418, 1998.
- EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature.**, **391(6665)**: 393-397, 1998.
- EREL, O.; KOCYIGIT, A.; GUREL M.S.; BULUT V.; SEYREK A.; OZDEMIR Y.; Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, **93(4)**: 491-494, 1998.
- ERJEFALT, I.; PERSSON, C.G. Increased sensitivity to toluene diisocyanate (TDI) in airways previously exposed to low doses of TDI. **Clin Exp Allergy.**, **22(9)**: 854-62, 1992.
- EVANS, J.H.; FERGUS, D.J.; LESLIE, C.C. Regulation of cytosolic phospholipase A2 translocation. **Advances in enzyme regulation.** , **43(1)**: 229-244, 2003.
- EVILEVITCH, V.; WU, T.T.; LINDGREN, L.; GREIFF, L.; NORRGREN, K.; WOLLMER, P. Time course of the inflammatory response to histamine and allergen skin prick test in guinea-pigs. **Acta Physiol Scand.**, **165(4)**: 409-413, 1999.
- FAIRBANKS, L.D.; RUCKEMANN, K.; QIU, Y.; HAWRYLOWICZ, C.M.; RICHARDS, D.F.; SWAMINATHAN, R.; KIRSCHBAUM, B.; SIMMONDS H.A. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? **Biochem J.**, **342(Pt 1)**: 143-152, 1999.
- FERREIRA, H.H.; LODO, M.L.; MARTINS, A.R.; KANDRATAVICIUS, L.; SALAROLI, A.F.; CONRAN, N.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. **Eur J Pharmacol.**, **442(1-2)**: 155-162, 2002.
- FITZGERALD, G.A.; CHENG, Y.; AUSTIN, S. COX-2 inhibitors and the cardiovascular system. **Clin Exp Rheumatol.**, **19(6 Suppl 25)**: S31-36, 2001.
- FLAHERTY, S.F.; GOLENBOCK, D.T.; MILHAM, F.H.; INGALLS, R.R. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. **J Surg Res.**, **73(1)**: 85-89, 1997.
- FRANGOIANNIS, N.G.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. **Cardiovasc Res.**, **53(1)**: 31-47, 2002.

- FRETIER, S.; BESSE, A.; DELWAIL, A.; GARCIA, M.; MOREL, F.; LEPRIVEY-LORGEOT, V.; WIJDENES, J.; PRALORAN, V.; LECRON, J.C. Cyclosporin A inhibition of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) production by activated human T lymphocytes. **J Leukoc Biol.**, **71(2)**: 289-294, 2002.
- FREW, A.J.; PLUMMERIDGE, M.J. Alternative agents in asthma. **J Allergy Clin Immunol.** **108(1)**: 3-10, 2001.
- FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm.**, **10(4)**: 223-227, 2001.
- FRODE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine.**, **17(3)**: 149-156, 2002.
- FUJISAKI, Y.; YAMAUCHI, A.; DOHGU, S.; SUNADA, K.; YAMAGUCHI, C.; OISHI, R.; KATAOKA, Y. Cyclosporine A-increased nitric oxide production in the rat dorsal hippocampus mediates convulsions. **Life Sci.**, **72(4-5)**: 549-556, 2002.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science.**, **294(5548)**: 1871-1875, 2001.
- GAHMBERG, C.G. Leukocyte adhesion group. Disponível em <<http://www.helsinki.fi/ml/biotiet/biokemia/lag/index.html>>. Acesso em 23/06/2003.
- GASSER, O.; HESS, C.; MIOT, S.; DEON, C.; SANCHEZ, J.C.; SCHIFFERLI, J.A. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. **Exp Cell Res.**, **285(2)**: 243-257, 2003.
- GENESTIER, L.; PAILLOT, R.; FOURNEL, S.; FERRARO, C.; MIOSSEC, P.; REVILLARD, J.P. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. **J Clin Invest.**, **102(2)**: 322-328, 1998.
- GENESTIER, L.; PAILLOT, R.; QUEMENEUR, L.; IZERADJENE, K.; REVILLARD, J.P. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology.**, **47(2-3)**: 247-257, 2000.
- GIAID, A.; SALEH, D.; LIM, S.; BARNES, P.J.; ERNST, P. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. **FASEB J.**, **12(11)**: 929-937, 1998.
- GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. Kuby: immunology. Disponível em: <

- <http://www.whfreeman.com/immunology/CH01/lymphocyteactivation.htm>>.
Acesso em: 18 de junho de 2003.
- GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.B. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, **126(1)**: 131-138, 1982.
- GREENBERG, S.S.; OUYANG, J.; ZHAO, X.; GILES, T.D. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. **Nitric Oxide.**, **2(3)**: 203-212, 1998.
- GREIFF, L.; WOLLMER, P.; ANDERSSON, M.; SVENSSON, C.; PERSSON, C.G. Effects of formoterol on histamine induced plasma exudation in induced sputum from normal subjects. **Thorax.**, **53(12)**: 1010-1013, 1998.
- GREIFF, L.; ANDERSSON, M.; ERJEFALT, J.S.; SVENSSON, C.; PERSSON, C.G. Loss of size-selectivity at histamine-induced exudation of plasma proteins in atopic nasal airways. **Clin Physiol Funct Imaging.**, **22(1)**: 28-31, 2002.
- GROOTEMAN, M.P.; VAN TELLINGEN, A.; VAN HOUTE, A.J.; BOS, J.C.; SCHOORL, M.; VAN LIMBEEK, J.; NUBE, M.J. Hemodialysis-induced degranulation of polymorphonuclear cells: no correlation between membrane markers and degranulation products. **Nephron.**, **85(3)**: 267-274, 2000.
- HÄMÄLÄINEN, M.; LAHTI, A.; MOILANEN, E. Calcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. **Eur J Pharmacol.**, **448(2-3)**: 239-244, 2002.
- HAN, L.; SAITO, H.; FUKATSU, K.; INOUE, T.; YASUHARA, H.; FURUKAWA, S.; MATSUDA, T.; LIN, M.T.; IKEDA, S. Ex vivo fluorescence microscopy provides simple and accurate assessment of neutrophil-endothelial adhesion in the rat lung. **Shock.**, **16(2)**: 143-147, 2001.
- HANSSON, M.J.; PERSSON, T.; FRIBERG, H.; KEEP, M.F.; REES, A.; WIELOCH, T.; ELMER, E. Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. **Brain Res.**, **960(1-2)**: 99-111, 2003.
- HAYEM, G.; DOMARLE, O.; THUONG-GUYOT, M.; POCIDALO, J.J.; MEYER, O. Effects of methotrexate on the oxidative metabolism of cultured rabbit articular chondrocytes. **J Rheumatol.**, **27(5)**: 1117-1120, 2000.
- HE, F.; MORITA, H.; OUWEHAND, A.C.; HOSODA, M.; HIRAMATSU, M.; KURISAKI, J.; ISOLAURI, E.; BENNO, Y.; SALMINEN, S. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains. **Microbiol Immunol.**, **46(11)**: 781-785, 2002.

- HENRIQUES, M.G. Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos. 1993. p. 1-181. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **Am J Respir Crit Care Med.**, **161(2)**: 117-119, 2000.
- HOLGATE, S.T. Airway inflammation and remodeling in asthma: current concepts. **Mol Biotechnol.**, **22(2)**: 179-189, 2002.
- HOLLER, E. Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease. **Curr Opin Hematol.**, **9(6)**: 479-484, 2002.
- HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen Pharmacol.**, **30(1)**: 5-11, 1998.
- HULKKONEN, J.; PERTOVAARA, M.; ANTONEN, J.; PASTERNAK, A.; HURME, M. IL-1 gene family haplotypes and Raynaud's phenomenon in primary Sjogren's syndrome. **Rheumatology (Oxford)**, **41(10)**: 1206-1208, 2002.
- JANG, D.; MURRELL, G.A. Nitric oxide in arthritis. **Free Radic Biol Med.**, **24(9)**: 1511-1519, 1998.
- JUNG, U.; NORMAN, K.E.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BEAUDET, A.L.; LEY, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. **J Clin Invest.**, **8(102)**: 1526-1533, 1998.
- KAYACAN, O.; KARNAK, D.; DELIBALTA, M.; BEDER, S.; KARACA, L.; TUTKAK, H. Adenosine deaminase activity in bronchoalveolar lavage in Turkish patients with smear negative pulmonary tuberculosis. **Respir Med.**, **96(7)**: 536-541, 2002.
- KAYAZAWA, M.; SAITOH, O.; KOJIMA, K.; NAKAGAWA, K.; TANAKA, S.; TABATA, K.; MATSUSE, R.; UCHIDA, K.; HOSHIMOTO, M.; HIRATA, I.; KATSU, K. Lactoferrin in whole gut lavage fluid as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. **Am J Gastroenterol.**, **97(2)**: 360-369, 2002.
- KILGORE, K.S.; WARD, P.A.; WARREN, J.S. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: the roles of P-selectin and platelet activating factor. **Inflammation.**, **22(6)**: 583-598, 1998.

- KIM, S.H.; JOHNSON, V.J.; SHARMA, R.P. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. **Nitric Oxide.**, **7(1)**: 67-74, 2002.
- KIM, H.S.; KIM, W.D.; LEE, Y.H. Production and Expression of Gro-alpha and RANTES by Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Patients with Kawasaki Disease and Measles. **J Korean Med Sci.**,**18(3)**: 381-386, 2003.
- KNIGHT, R.J.; KERMAN, R.H.; ZELA, S.; PODDER, H.; VAN BUREN, C.T.; KATZ, S.; KAHAN, B.D. Thymoglobulin, sirolimus, and reduced-dose cyclosporine provides excellent rejection prophylaxis for pancreas transplantation. **Transplantation.**, **75(8)**: 1301-1306, 2003.
- KONIKOVA, E.; GLASOVA, M.; KUSENDA, J.; BABUSIKOVA, O. Intracellular markers in acute myeloid leukemia diagnosis. **Neoplasma.**, **45(5)**: 282-291, 1998.
- KRAAN, M.C.; DE KOSTER, B.M.; ELFERINK, J.G.; POST, W.J.; BREEDVELD, F.C.; TAK, P.P.; Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients. **Arthritis Rheum.**, **43(7)**: 1488-1495, 2000.
- KULIDJIAN, A.A.; INMAN, R.; ISSEKUTZ, T.B. Rodent models of lymphocyte migration. **Semin Immunol.**, **11(2)**: 85-93, 1999.
- LATEY, F. Aspects of Inflammation. **Journal of bodywork and movement therapies.**, **2(5)**: 124-131, 2001.
- LAVAGNO, L.; BORDIN, G.; COLANGELO, D.; VIANO, I.; BRUNELLESCHI, S. Tachykinin activation of human monocytes from patients with rheumatoid arthritis: in vitro and ex-vivo effects of cyclosporin A. **Neuropeptides.**, **35(2)**: 92-99, 2001.
- LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; MEINI, S.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C.A. Tachykinin-mediated effect of nociceptin in the rat urinary bladder in vivo. **Eur J Pharmacol.**, **389(1)**: 99-102, 2000.
- LEE, J.K.; CHOI, S.S.; WON, J.S.; SUH, H.W. The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in C6 cells: involvement of AP-1 and NFkappaB. **Life Sci.**, **73(5)**: 595-609, 2003.
- LEONARDI, A.; DEFRANCHIS, G.; FREGONA, I.A.; VIOLATO, D.; PLEBANI, M.; SECCHI, A.G. Effects of cyclosporin A on human conjunctival fibroblasts. **Arch Ophthalmol.**, **19(10)**: 1512-1517, 2001.
- LEY, K.; ALLIETTA, M.; BULLARD, D.C.; MORGAN, S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. **Circ Res.**, **83(3)**: 287-294, 1998.

- LIU, X.J.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. Potentiation of formalin-evoked adenosine release by an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor in the rat hind paw: a microdialysis study. **Eur J Pharmacol.**, **408(2)**: 143-152, 2000.
- LLUIS, C.; FRANCO, R.; CORDERO, O. Ecto-ADA in the development of the immune system. **Immunol Today.**, **19(11)**: 533-534, 1998.
- LOSSOS, I. S.; IZBICKI, G.; OR, R.; GOLDSTEIN, R. H.; BREUER, R. The effects of suramin on bleomycin-induced lung injury. **Life Science.**, **67(23)**: 2873-2881, 2000.
- LUM, A.F.; GREEN, C.E.; LEE, G.R.; STAUNTON, D.E.; SIMON, S.I. Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow. **J Biol Chem.**, **277(23)**: 20660-20670, 2002.
- LUZ, G.P.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Análise do lavado brônquico obtido de ratos normais e sensibilizados pela ovoalbumina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, XI, Caxambú, 1993.
- MABLEY, J.; SORIANO, F.; PACHER, P.; HASKO, G.; MARTON, A.; WALLACE, R.; SALZMAN, A.; SZABO, C. The adenosine A₃ receptor agonist, N(6)-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. **Eur J Pharmacol.**, **466(3)**: 323-329, 2003.
- MACKAY, C.R.; IMHOF, B.A. Cell adhesion in the immune system. **Immunol Today.**, **14(3)**: 99-102, 1993.
- MAJUMDAR, S.; AGGARWAL, B.B. Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaB alpha phosphorylation and degradation. **J Immunol.**, **167(5)**: 2911-2920, 2001.
- MARCIL, I.; STERN, R.S. Squamous-cell cancer of the skin in patients given PUVA and ciclosporin: nested cohort crossover study. **Lancet.**, **358(9287)**: 1042-1045, 2001.
- MARIANI, M.; PANINA-BORDIGNON, P. Analysis of homing receptor expression on infiltrating leukocytes in disease states. **J Immunol Methods.**, **273(1-2)**: 103-114, 2003.
- MARKOVIC, S.; RAAB, M.; DAXECKER, H.; GRIESMACHER, A.; KARIMI, A.; MULLER, M.M. In vitro effects of cyclosporin A on the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. **Clin Chim Acta.**, **316(1-2)**: 25-31, 2002.
- MATSUNAGA, T.; WEIHRAUCH, D.W.; MONIZ, M.C.; TESSMER, J.; WARLTIER, D.C.; CHILIAN, W.M. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis

- during impaired production of nitric oxide. **Circulation.**, **105(18)**: 2185-2191, 2002.
- MAYER, A.D.; DMITREWSKI, J.; SQUIFFLET, J.P.; BESSE, T.; GRABENSEE, B.; KLEIN, B.; EIGLER, F.W.; HEEMANN, U.; PICHLMAYR, R.; BEHREND, M.; VANRENTERGHEM, Y.; DONCK, J.; VAN HOOFF, J.; CHRISTIAANS, M.; MORALES, J.M.; ANDRES, A.; JOHNSON, R.W.; SHORT, C.; BUCHHOLZ, B.; REHMERT, N.; LAND, W.; SCHLEIBNER, S.; FORSYTHE, J.L.; TALBOT, D.; POHANKA, E., et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. **Transplantation.**, **64(3)**: 436-443, 1997.
- MCDONALD, D.M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation.**, **6(1)**: 7-22, 1999.
- MINE, S.; TABATA, T.; WADA, Y.; FUJISAKI, T.; IIDA, T.; NOGUCHI, N.; NIKI, E.; KODAMA, T.; TANAKA, Y. Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. **Atherosclerosis.**, **160(2)**: 281-288, 2002.
- MIZGERD, J.P.; KUBO, H.; KUTKOSKI, G.J.; BHAGWAN, S.D.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BEAUDET, A.L.; DOERSCHUK, C.M. Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. **J Exp Med.**, **186(8)**: 1357-1364, 1997.
- MOLERO, L.; GARCIA-DURAN, M.; DIAZ-RECASENS, J.; RICO, L.; CASADO, S.; LOPEZ-FARRE, A. Expression of estrogen receptor subtypes and neuronal nitric oxide synthase in neutrophils from women and men: regulation by estrogen. **Cardiovasc Res.**, **56(1)**: 43-51, 2002.
- MONTESINOS, M.C.; YAP, J.S.; DESAI, A.; POSADAS, I.; MCCRARY, C.T.; CRONSTEIN, B.N. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. **Arthritis Rheum.**, **43(3)**: 656-663, 2002.
- MORABITO, L.; MONTESINOS, M.C.; SCHREIBMAN, D.M.; BALTER, L.; THOMPSON, L.F.; RESTA, R.; CARLIN, G.; HUIE, M.A.; CRONSTEIN, B.N. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. **J Clin Invest.**, **101(2)**: 295-300, 1998.
- MOTOHIRO, A.; FURUKAWA, K.; YASUMOTO, K.; INOKUCHI, K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. **Eur Surg Res.**, **18(1)**: 50-57, 1986.

- MUHL, H.; DINARELLO, C.A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. **J Immunol.**, **159(10)**: 5063-5069, 1997.
- MÜLLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol.**, **24(6)**: 326-333, 2003.
- OBERBAUER, R.; HUTCHISON, B.; ERIS, J.; ARIAS, M.; CLAESSION, K.; MOTA, A.; KREIS, H.; KLEINMAN, L.; WANG, F.; CHEN, J.; REVICKI, D.A. Health-related quality-of-life outcomes of sirolimus-treated kidney transplant patients after elimination of cyclosporine A: results of a 2-year randomized clinical trial. **Transplantation.**, **75(8)**: 1277-1285, 2003.
- O'CALLAGHAN, J.W.; FORREST, M.J.; BROOKS, P.M. Inhibition of neutrophil chemotaxis in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. **Rheumatol Int.**, **8(1)**: 41-45, 1988.
- OLIVER, S.J.; CHENG, T.P.; BANQUERIGO, M.L.; BRAHN, E. Suppression of collagen-induced arthritis by an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, in combination with cyclosporin: reduction of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Cell Immunol.**, **166(2)**: 196-206, 1995.
- PANETTA, J.C.; YANISHEVSKI, Y.; PUI, C.H.; SANDLUND, J.T.; RUBNITZ, J.; RIVERA, G.K.; RIBEIRO, R.; EVANS, W.E.; RELLING, M.V. A mathematical model of in vivo methotrexate accumulation in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Chemother Pharmacol.**, **50(5)**: 419-428, 2002.
- PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. **Biochem Pharmacol.**, **65(2)**: 153-159, 2003.
- PANÉS, J. Adhesion molecules: their role in physiopathology and treatment of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Hepatol.**, **22(10)**: 514-524, 1999.
- PIVOT, X.; AWADA, A.; GEDOUIN, D.; KERGER, J.; ROLLAND, F.; CUPISSOL, D.; CAPONIGRO, F.; COMELLA, G.; LOPEZ-POUSA, J.J.; GUARDIOLA, E.; GIROUX, B.; GERARD, B.; SCHNEIDER, M. Results of randomised phase II studies comparing S16020 with methotrexate in patients with recurrent head and neck cancer. **Ann Oncol.**, **14(3)**: 373-377, 2003.
- PIZZO, P.A. O hospedeiro comprometido. In: CECIL TRATADO DE MEDICINA INTERNA. Rio de Janeiro, 1997. p: 1701.
- PORGES, Y.; BLUMEN, S.; FIREMAN, Z.; STERNBERG, A.; ZAMIR, D. Cyclosporine-induced optic neuropathy, ophthalmoplegia, and nystagmus in a patient with Crohn disease. **Am J Ophthalmol.**, **126(4)**: 607-609, 1998.

- PYRZYNSKA, B.; LIS, A.; MOSIENIAK, G.; KAMINSKA, B. Cyclosporin A-sensitive signaling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes. **Neurochem Int.**, **38(5)**: 409-415, 2001.
- QIN, L.; QUINLAN, W.M.; DOYLE, N.A.; GRAHAM, L.; SLIGH, J.E.; TAKEI, F.; BEAUDET, A.L.; DOERSCHUK, C.M. The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in mice. **J Immunol.**, **157(11)**: 5016-5021, 1996.
- RAFIEE, P.; JOHNSON, C.P.; LI, M.S.; OGAWA, H.; HEIDEMANN, J.; FISHER, P.J.; LAMIRAND, T.H.; OTTERSON, M.F.; WILSON, K.T.; BINION, D.G. Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS. Paradoxical proinflammatory effect on the microvascular endothelium. **J Biol Chem.**, **277(38)**: 35605-35615, 2002.
- RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, **17(1)**: 723-741, 1993.
- REYNOLDS, W.F.; STEGEMAN, C.A.; COHEN-TERVAERT, J.W. 463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. **Clin Immunol.**, **103(2)**: 154-160, 2002.
- RHODEN, E.L.; RHODEN, C.R.; LUCAS, M.L.; PEREIRA-LIMA, L.; ZETTLER, C.; BELLO-KLEIN, A. The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Transpl Immunol.**, **10(4)**: 277-284, 2002.
- RIDGER, V.C.; WAGNER, B.E.; WALLACE, W.A.; HELLEWELL, P.G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. **J Immunol.**, **166(5)**: 3484-3490, 2001.
- RINCON, J.; PARRA, G.; QUIROZ, Y.; BENATUIL, L.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Cyclosporin A reduces expression of adhesion molecules in the kidney of rats with chronic serum sickness. **Clin Exp Immunol.**, **121(2)**: 391-398, 2000.
- ROBBINS, R.A.; JINKINS, P.A.; BRYAN, T.W.; PRADO, S.C.; MILLIGAN, S.A. Methotrexate inhibition of inducible nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells in vitro. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, **18(6)**: 853-885, 1998.
- ROCCA, B.; FITZGERALD, G.A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **Int Immunopharmacol.**, **2(5)**: 603-630, 2002.
- RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem Biophys Res Commun.**, **292(4)**: 869-873, 2002.

- ROSENBERGER, C.M.; FINLAY, B.B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, **4(5)**: 385-396, 2003.
- ROUZAUT, A.; SUBIRA, M.L.; DE MIGUEL, C.; DOMINGO-DE-MIGUEL, E.; GONZALEZ, A.; SANTIAGO, E.; LOPEZ-MORATALLA, N. Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. **Biochim Biophys Acta.**, **1451(2-3)**: 319-333, 1999.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Brit. J. Pharmacol.**, **118(23)**: 811-819, 1996.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur. J. Pharmacol.**, **331(1)**: 43-52, 1997.
- SALEH, T.S.F.; VIANNA, R.M.J.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CHAKRAVARTY, B.J.M.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. Oral-anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, **363(2-3)**: 179-187, 1998.
- SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides.**, **20(8)**: 949-956, 1999.
- SANNINO, P.; SHOUSHA, S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. **J Clin Pathol.**, **47(1)**: 90-92, 1994.
- SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.; KLEIN, P.; KRIEG, T. Cellular and molecular mechanisms of tissue repair. **Basic Res Cardiol.**, **3(1-3)**: 1998.
- SCHNABEL, A. Methotrexate: Mechanisms of action, pharmacology and toxicology. In: IMMUNOSUPPRESSION IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES. STANDARDS, NEW DEVELOPMENTS, FUTURE TRENDS. Dordrecht, 2001, p. 113-118.
- SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: TEXTBOOK OF IMMUNOPHARMACOLOGY, New York, 1989. p. 253-261.
- SEDIVA, A.; KOLAROVA, I.; BARTUNKOVA, J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children. **Eur J Pediatr.**, **157(12)**: 987-991, 1998.

- SEITZ, M. Molecular and cellular effects of methotrexate. **Curr Opin Rheumatol.**, **11(3)**: 226-232, 1999.
- SEITZ, M.; DAYER, J.M. Enhanced production of tissue inhibitor of metalloproteinases by peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients responding to methotrexate treatment. **Rheumatology (Oxford)**., **39(6)**: 637-645, 2000.
- SIEGELMAN, M.H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **J Clin Invest.**, **105(5)**: 683-691, 2000.
- SIHRA, B.S.; KON, O.M.; DURHAM, S.R.; WALKER, S.; BARNES, N.C.; KAY, A.B. Effect of cyclosporin A on the allergen-induced late asthmatic reaction. **Thorax.**, **52(5)**: 447-452, 1997.
- SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **J Pathol Bact.**, **72(1)**: 367-380, 1956.
- SPISANI, S.; FABBRI, E.; MUCCINELLI, M.; CARIANI, A.; BARBIN, L.; TROTTA, F.; DOVIGO, L. Inhibition of neutrophil responses by cyclosporin A. An insight into molecular mechanisms. **Rheumatology (Oxford)**., **40(7)**: 794-800, 2001.
- STADNYK, A.W.; DOLLARD, C.; ISSEKUTZ, T.B.; ISSEKUTZ, A.C. Neutrophil migration into indomethacin induced rat small intestinal injury is CD11a/CD18 and D11b/CD18 co-dependent. **Gut.**, **50(5)**: 629-635, 2002.
- STVRTINOVÁ, V.; JAKUBOVSKY, J.; HULÍN, I. Inflammation and fever. Disponível em: <<http://nic.sav.sk/logos/books/scientific/z.html>>. Acesso em: 18 de junho de 2003.
- SUBONGKOT, S.; FRAME, D.; LESLIE, W.; DRAJER, D. Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. **Pharmacotherapy.**, **23(1)**: 9-28, 2003.
- SUNG, J.Y.; HONG, J.H.; KANG, H.S.; CHOI, I.; LIM, S.D.; LEE, J.K.; SEOK, J.H.; LEE, J.H.; HUR, G.M. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. **Immunopharmacology.**, **47(1)**: 35-44, 2000.
- SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicology Letters.**, **140(141)**: 105-112, 2003.
- TAKEDA, T.; NAIKI, Y.; YONEKAWA, S.; SAKAGUCHI, M.; IWAMOTO, I.; TANAKA, H.; HASEGAWA, H.; IMADA, A.; KANAMARU, A.; HIRUMA, S.; MAEKURA, S.; HASHIMOTO, S.; YAMAZUMI, T. An experience of treatment

- of double positive myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) and anti-glomerular basement membrane antibodies in Goodpasture's syndrome onset of crescentic glomerulonephritis. **Nippon Jinzo Gakkai Shi.**, **40(8)**: 591-6, 1998.
- TANG, A.T.; GERAGHTY, P.; DASCOMBE, M.J.; JARVIS, J.C.; SALMONS, S.; HOOPER, T.L. Nitroglycerine reduces neutrophil activation and acute damage in latissimus dorsi muscle grafts. **Ann Thorac Surg.**, **66(6)**: 2015-2021, 1998.
- TACHIMOTO, H.; EBISAWA, M.; BOCHNER, B.S. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. **Int Arch Allergy Immunol.**, **128(1)**: 18-20, 2002.
- TORREZ-ALVAREZ, B.; BARANDA, L.; FUENTES-AHUMADA, C.; MONCADA, B.; GONZÁLEZ-AMARO, R. Effects of methotrexate on the expression of cell adhesion molecules in psoriasis. **Journal of Dermatological Science.**, **16(1)**: s173, 1998.
- TRAJKOVIC, V.; BADOVINAC, V.; JANKOVIC, V.; MOSTARICA-STOJKOVIC, M. Cyclosporin A inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in C6 glioma cell line. **Brain Res.**, **816(1)**: 92-98, 1999.
- TRUFFA-BACHI, P.; LEFKOVITS, I.I.; RUDOLF FREY, J. Proteomic analysis of T cell activation in the presence of cyclosporin A: immunosuppressor and activator removal induces de novo protein synthesis. **Mol Immunol.**, **37(5)**: 261, 2000.
- TSAI, J.J.; WANG, T.F.; WANG, S.R. The inhibitory effect of methotrexate on PAF-induced neutrophil and eosinophil locomotion in asthmatic patients. **Asian Pac J Allergy Immunol.**, **12(1)**: 65-71, 1994.
- TSUJI, S.; TANIUCHI, S.; HASUI, M.; YAMAMOTO, A.; KOBAYASHI, Y. Increased nitric oxide production by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on trimethoprim-sulfamethoxazole. **Nitric Oxide.**, **7(4)**: 283-288, 2002.
- TURUTIN, D.V.; KUBAREVA, E.A.; PUSHKAREVA, M.A.; ULLRICH, V.; SUD'INA, G.F. Activation of NF-kappa B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. **FEBS Lett.**, **536(1-3)**: 241-245, 2003.
- VERDIER, C. Rolling, adhesion and transmigration of a leucocyte on the endothelium lining. Disponível em < <http://rheologie.ujf-grenoble.fr/~verdier/interests.html> >. Acesso em 23/06/2003.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed. Proc.**, **41(1)**: 2588-2595, 1976.

- WALRAND, S.; VALEIX, S.; RODRIGUEZ, C.; LIGOT, P.; CHASSAGNE, J.; VASSON, M.P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clin Chim Acta.**, **331(1-2)**: 103-110, 2003.
- WALZOG, B.; WEINMANN, P.; JEBLONSKI, F.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BOMMERT, K.; GAEHTGENS, P. A role for beta(2) integrins (CD11/CD18) in the regulation of cytokine gene expression of polymorphonuclear neutrophils during the inflammatory response. **FASEB J.**, **13(13)**: 1855-1865, 1999.
- WANG, Q.; TEDER, P.; JUDD, N.P.; NOBLE, P.W.; DOERSCHUK, C.M. CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in Escherichia coli pneumonia in mice. **Am J Pathol.**, **161(6)**: 2219-2228, 2002.
- WEINBLATT, M.E.; MAIER, A.L.; FRASER, P.A.; COBLYN, J.S. Longterm prospective study of methotrexate in rheumatoid arthritis: conclusion after 132 months of therapy. **J Rheumatol.**, **25(2)**: 238-242, 1998.
- WILDHIRT, S.M.; WEIS, M.; SCHULZE, C.; CONRAD, N.; PEHLIVANLI, S.; RIEDER, G.; ENDERS, G.; VON SCHEIDT, W.; REICHART, B. Coronary flow reserve and nitric oxide synthases after cardiac transplantation in humans. **Eur J Cardiothorac Surg.**, **19(6)**: 840-847, 2001.
- WILLEKE, T.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; GAEHTGENS, P.; WALZOG, B. A role for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated tyrosine signaling in extravasation of human polymorphonuclear neutrophils. **Biorheology.**, **38(2-3)**: 89-100, 2001.
- WINKELSTEIN, A.. Effects of cytotoxic immunosuppressants on tuberculin-sensitive lymphocytes in guinea pigs. **J Clin Invest.**, **56(6)**: 1587-1596, 1975.
- WONG, M.M.; FISH, E.M. Chemokines: attractive mediators of the immune response. **Semin Immunol.**, **15(1)**: 5-14, 2003.
- YAMAMOTO, S.; DUNN, C.J.; CAPASSO, F.; DEPORTER, D.A.; WILLOUGHBY, D.A.; HUSKISSON, E.C. Quantitative studies on cell-mediated immunity in the pleural cavity of guinea pigs. **J Pathol.**, **117(2)**: 65-73, 1975.
- ZHANG, C.H.; DAVIS, W.C.; GRUNIG, G.; ANTCZAK, D.F. The equine homologue of LFA-1 (CD11a/CD18): cellular distribution and differential determinants. **Vet Immunol Immunopathol.**, **62(2)**: 167-183, 1998.
- ZHANG, W.; SMITH, C.; MONETTE, R.; HUTCHISON, J.; STANIMIROVIC, D.B. Indomethacin and cyclosporin a inhibit in vitro ischemia-induced expression of ICAM-1 and chemokines in human brain endothelial cells. **Acta Neurochir Suppl.**, **76(1)**: 47-53, 2000.

ZIDEK, Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. **Eur Cytokine Netw.**, **10(3)**: 319-328, 1999.