



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

SILVANA VIRGINIA GAGLIOTTI VIGIL

**Estudo do efeito do Tacrolimus sobre a resposta inflamatória
induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em
camundongos**

Florianópolis

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

SILVANA VIRGINIA GAGLIOTTI VIGIL

Estudo do Tacrolimus sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia, sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde.

Florianópolis

2008

A Pedra

“O distraído nela tropeçou. O bruto a usou como projétil. O empreendedor, usando-a, construiu. O camponês, cansado da lida, dela fez assento. Para meninos, foi brinquedo. Drummond a poetizou. Já, David matou Golias e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura. E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem! Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu próprio crescimento.”

(Autor desconhecido)

A meus pais, José Luiz e Maria Inés, por todo amor, apoio e incentivo incondicional. Cada etapa da minha vida é uma conquista nossa.

A minha avó, meus irmãos e amigos, pelos momentos de alegria, companheirismo e compreensão.

A professora Dra. Tânia Silvia Fröde pelos anos de dedicação, amizade e inestimável contribuição para minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida e por dar-me saúde e equilíbrio para superar os obstáculos durante minha caminhada, não me deixando perder as esperanças nem desistir dos meus objetivos.

Aos meus pais, José Luiz Fortunato Vigil e Maria Inés Gagliotti de Vigil, que sempre acreditaram em mim, deram apoio, incentivo, amor e estrutura para chegar cada vez mais longe e sonhar cada vez mais alto. Pai e mãe, a vocês dedico minha eterna gratidão.

À minha avó Teresa Alvarez, aos meus irmãos Anna Karenina G. Vigil e Martin Augusto G. Vigil, aos meus tios José Luis Gagliotti e Nádia Gagliotti e ao meu primo Guilherme Gagliotti por todos os momentos de alegria e companheirismo. Graças a Deus eu tenho vocês. Graças a Deus eu tenho uma família.

Aos amigos do laboratório registro meus sinceros agradecimentos. Obedecendo à ordem cronológica dos acontecimentos, agradeço ao Eduardo Dalmarco, à Vanessa Valgas, ao Marcelo Spillere, à Denise Geremias e ao Álvaro Vargas. A todos vocês obrigada pela amizade e por tudo que me ensinaram durante minha iniciação científica. Aos meus amigos, Robson Pereira, Ziliani Buss, Silvana Zucolotto, Janaína Koelzer, Jucélia Benincá, Vanessa Engelmann, Gustavo do Reis, Giliard Astolfi e Diana Pereira, pelos momentos de alegria, pelos experimentos realizados juntos, pelos congressos, enfim obrigada por tudo. À Stella Goulart pelos momentos inesquecíveis, por sua eterna amizade, companheirismo e apoio dentro e fora do laboratório. Ao Rafael de Liz por ter sido tão importante nesta fase da minha vida e por ter me acompanhado durante essa caminhada. Obrigada pelos momentos de alegria, apoio e incentivo.

Às minhas amigas Flora Ewerling, Janaína Basílio, Amanda Santos, Luciana Leite, Rosana Alves, Gabriela Borsatto, Ananda Caixeta, Ângela Bet, Andréia Voigt e Samira Nienkoter que, presentes ou não, sempre me deram força e acreditaram em mim.

À professora Dra. Tânia Silvia Fröde por todos os anos de dedicação, orientação, paciência e confiança em mim depositada.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores e funcionários da Graduação e do Programa de Pós-graduação em Farmácia por minha formação e pela oportunidade de adquirir novos e importantes conhecimentos. Enfim, a todos aqueles que acreditaram em mim e que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho e a todos aqueles que fazem parte da minha vida, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIACÕES	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 TACROLIMUS	12
1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO	13
1.3 MODELOS DE INFLAMAÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 ARTIGO PUBLICADO - Transplant Immunology	23
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÕES	45
6 PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A: Protocolo do estudo da atividade antiinflamatória do tacrolimus	58
ANEXO A: Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais	60

LISTA DE ABREVIÇÕES

A ₁	Receptor de adenosina tipo 1
A _{2A}	Receptor de adenosina tipo 2A
A _{2B}	Receptor de adenosina tipo 2B
A ₃	Receptor de adenosina tipo 3
ADA	Adenosina-deaminase
ADA-1	Adenosina-deaminase isoforma 1
ADA-2	Adenosina-deaminase isoforma 2
ALT	Alanina aminotransferase
ALT-146e	Agonista seletivo para receptor A ₃
APP	Inibidor de adenosina-deaminase
BSA	Albumina sérica bovina
C	Família de quemocinas quimiotáticas para linfócitos T
CC	Família de quemocinas quimiotáticas para monócitos, macrófagos, basófilos, linfócitos T e eosinófilos
CD11b/CD18	Molécula de adesão do tipo β 2-integrina expressa em neutrófilos
CD66	Molécula de adesão expressa em neutrófilos
CD67	Molécula de adesão expressa em neutrófilos
CF-101	Agonista de receptor A ₃
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CsA	Ciclosporina A
CV	Coefficiente de variação
CXC	Família de quemocinas quimiotáticas para neutrófilos, linfócitos T e B e células <i>Natural Killer</i>
CX ₃ C	Família de quemocinas quimiotáticas para linfócitos T e células <i>Natural Killer</i>
CXCR1	Receptor 1 de quemocinas CXC
CXCR2	Receptor 2 de quemocinas CXC
DF 2162	Inibidor de receptores para quemocinas CXC
ELISA	Enzima imuno ensaio
E-selectina	Molécula de adesão do tipo Selectina, expressa em células endoteliais
FKBP-12	Proteína intracelular chamada imunofilina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
HaCAT	Linhagem celular de queratinócitos humanos
HMVEC	Células endoteliais da microvasculatura humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular tipo 1
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1Ra	Antagonista natural do receptor de IL-1 β
IL-2	Interleucina-2
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-17	Interleucina-17
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Endovenosa
KC	Quemocina de neutrófilo
LFA-1	Antígeno relacionado à função do leucócito-1
L-NAME	L-nitroarginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
L- selectina	Molécula de adesão do tipo Selectina expressa em leucócitos
Mac-1	Antígeno de macrófago-1
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago-2
MMP25	Matriz Metaloproteinase 25

LISTA DE ABREVIações

MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-AT	Fator nuclear de linfócitos T ativados
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO ^x	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSe	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células endoteliais
NOSn	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células neuronais
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
O ₃	Ozônio
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ ou Prostaciclina
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
p.o.	Via oral
P-selectina	Molécula de adesão do tipo Selectina expressa em plaquetas
RANTES	Quemocina secretada, expressa e regulada sob ativação de linfócitos T normais
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
s.c	Via subcutânea
Tac	Tacrolimus
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão vascular tipo 1
v.o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Atividade antiinflamatória proposta para o tacrolimus

46

RESUMO

Estudo do Tacrolimus sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos

Introdução: Tacrolimus é um imunossupressor da classe dos macrolídeos utilizado na clínica para evitar a rejeição em transplantes de órgãos e no tratamento da dermatite atópica.

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi elucidar a atividade antiinflamatória do tacrolimus na inflamação induzida pela carragenina, no modelo da bolsa de ar, em camundongos.

Metodologia: Camundongos albinos Swiss receberam injeção de 1,5 ml de ar no dorso, durante três dias alternados, para formação da bolsa de ar. No sexto dia, os animais receberam carragenina (Cg, 1%, s.c.) e 24 h após foram sacrificados e a bolsa foi aberta e lavada com 1 ml de salina estéril. Os parâmetros inflamatórios observados foram: acúmulo de leucócitos, exsudação, atividade da mieloperoxidase (MPO) e da adenosina-deaminase (ADA), concentração de nitrato/nitrito (NO^x) e níveis de fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e quimiocina para neutrófilo (KC) foram avaliados 24 h depois. Para avaliar a exsudação, 1 h antes da Cg foi administrado 0,2 ml de azul de Evans (25 mg/kg, i.v.). Para determinação da curva dose e tempo resposta, inicialmente diferentes grupos de animais receberam diferentes doses de tacrolimus (1 a 10 mg/kg, v.o.) 0,5 h antes da injeção de carragenina e a migração celular e a exsudação foram avaliadas 24 h após. Em outros experimentos, diferentes grupos receberam uma única dose de tacrolimus (2 mg/kg, v.o.) em diferentes períodos de tempo (0,5 – 4 h) e os parâmetros inflamatórios foram avaliados 24 h após. De acordo com este protocolo, tacrolimus (2 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da Cg, foi utilizado para analisar o seu efeito sobre a atividade de MPO e ADA e níveis de NO^x , $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e KC. A indometacina (5 mg/kg, i.p.) e a dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) foram utilizadas como fármacos de referência. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett ou teste t de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados: O tacrolimus (Tac: 2 mg/kg, v.o.) inibiu o acúmulo de leucócitos e de neutrófilos e reduziu a exsudação, os níveis de $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, KC e óxido nítrico, além da atividade da MPO e da ADA ($P < 0,05$).

Conclusão: Estes resultados demonstram que o tacrolimus apresenta importante atividade antiinflamatória, similar a da indometacina e da dexametasona. A inibição de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1, KC), enzimas (MPO e ADA) e liberação de mediadores inflamatórios (NO^x) parecem fazer parte da atividade antiinflamatória do tacrolimus.

Unitermos: Tacrolimus, inflamação, bolsa de ar, mediadores da inflamação, camundongos.

ABSTRACT

Study of Tacrolimus on the inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of air pouch.

Background: Tacrolimus is a macrolide immunosuppressant drug widely used for organ transplantation and to treat atopic dermatitis.

Objective: The aim of the present work was to evaluate the mechanisms of anti-inflammatory action of tacrolimus in the air pouch model induced by carrageenan, in mice.

Methods: Swiss mice received injections of 1.5 ml of air on three alternated days to induce the air pouch. On the sixth day, the animals received carrageenan (Cg, 1%, s.c.) and 24 h later were sacrificed. Their cavities of air pouch were open and were washed with 1.0 ml of sterile saline. The inflammatory parameters: leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities, nitrate/nitrite concentrations (NO^x), tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and chemokines to neutrophils (KC) levels were evaluate 24 h after. To evaluate the exudation a group of animals received 0.2 ml of Evans blue dye (25 mg/ kg, i.v.) 0.5 h before Cg administration. To establish a standard for tacrolimus, together with the dose and timing to be used in the experiments, different groups of animals were treated with different doses of tacrolimus (1 to 10 mg/kg, p.o.) 0.5 h before carrageenan injection and the cell migration and exudation were analyzed after 24 h. In another set of experiments, different groups of animals were pretreated with a single dose of tacrolimus (2 mg/kg, p.o.), at different time points (0.5 - 4 h), and the inflammatory parameters were evaluated 24 h after. According to this protocol, tacrolimus (2 mg/kg, p.o.) administered 0.5 h before Cg injection, was selected the dose to be used to analyze its effect upon MPO, ADA, NO^x , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and KC levels. Indomethacin (5.0 mg/kg, i.p.) and dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.) were used as reference drug. Data is reported as the mean \pm standard error of the mean. Significant differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA), Dunnett or Student's t tests. $P < 0.05$ was considered as indicative of significance.

Results: Tacrolimus (Tac: 2.0 mg/kg, p.o.) significantly inhibited leukocyte and neutrophils accumulation, exudation, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, KC, nitric oxide levels and MPO and ADA activities ($P < 0.05$)

Conclusion: These results indicate that tacrolimus shows important anti-inflammatory properties and the majority of its actions were similar to those induced by indomethacin and dexamethasone. The inhibition of proinflammatory cytokine ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, KC), enzyme (MPO and ADA) and mediator (NO^x) release and/or action appears to account for tacrolimus's action.

Keywords: Tacrolimus, inflammation, air pouch, mediators of inflammation, mice.

1 INTRODUÇÃO

1.1 TACROLIMUS

O tacrolimus, também conhecido como FK506, é um fármaco imunossupressor da classe dos macrolídeos, isolado do *Streptomyces tsukubaensis* (KINO et al., 1987). Trata-se de um fármaco utilizado para evitar a rejeição no transplante de órgãos (BUSH; LIN, 2006; MCCORMACK; KEATING, 2006; WENTE et al., 2006), na dermatite atópica (NAKAGAWA, 2006) e na psoríase (EZQUERRA et al., 2006). Estudos clínicos têm revelado a eficácia do tacrolimus no tratamento da artrite reumatóide (KITAHARA; KAWAI, 2007). O tacrolimus, assim como a ciclosporina A, pertence à classe de imunossupressores denominada inibidores da calcineurina e exerce atividade imunossupressora através da inibição da ativação dos linfócitos T (ROEHRL et al., 2004). Mesmo pertencendo à mesma classe de imunossupressores, estudos revelam que o tacrolimus é até 100 vezes mais potente que a ciclosporina A (ALLISON, 2000).

O mecanismo de ação do tacrolimus envolve a formação de um imunocomplexo por meio da ligação do fármaco à proteína intracelular FKBP-12. Este complexo promove a inibição da calcineurina fosfatase, enzima envolvida na desfosforilação e conseqüente ativação do fator nuclear de linfócitos T ativados (NF-AT), que é necessário para a expressão de genes que expressam citocinas, ativando os linfócitos T (ROEHRL et al., 2004). Desta forma, a inibição da calcineurina pelo tacrolimus resulta no bloqueio da produção e liberação de diversas citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), pelas células T (VENKATESH et al., 2004).

Além do efeito imunossupressor, o tacrolimus também apresenta propriedades antiinflamatórias. Sasakawa et al., (2005) demonstraram que o tacrolimus inibe a síntese de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β , em modelos experimentais *in vitro* de artrite. Além disso, Lan et al., (2005) demonstraram que o tacrolimus inibe a secreção de TNF- α por queratinócitos humanos via inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B).

Apesar do tacrolimus apresentar potencial atividade antiinflamatória em modelos animais, o mecanismo pelo qual este fármaco exerce o efeito antiinflamatório ainda permanece pouco esclarecido.

Uma vez que estamos estudando o efeito antiinflamatório do tacrolimus, é pertinente comentar alguns aspectos importantes da resposta inflamatória.

1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um processo biológico intensamente estudado desde o início do século XIX. A inflamação é uma resposta fisiológica desencadeada por lesão tecidual ou estímulos antigênicos e que muitas vezes pode ser prejudicial ao organismo (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; RAO et al., 2007).

Clinicamente, a inflamação é caracterizada por apresentar cinco sinais cardinais: eritema, edema, calor, dor e perda da função (HEIDLAND et al., 2006). Porém, esse processo pode ser definido como uma cascata inflamatória, pelo qual ocorre a ativação de mediadores e células que tem como objetivo o reparo do tecido lesado (SUZUKI et al., 2003; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

De uma forma didática, o processo inflamatório pode ser dividido em três diferentes fases. Inicialmente, ocorre uma fase aguda, de duração variável e que é caracterizada pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. Esta etapa do processo inflamatório é seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas. Por fim, ocorre a fase de resolução da inflamação, quando acontece a regeneração tecidual e fibrose (SUZUKI et al., 2003; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A vasodilatação, característica da fase aguda, ocorre devido à liberação local de diferentes mediadores químicos, tais como óxido nítrico (NO^x), cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, fração C5a do sistema complemento, prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) e substâncias liberadas das terminações nervosas, como as taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre muitos outros (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A fase subaguda é acompanhada pela migração de leucócitos e de outras células fagocitárias para o sítio de inflamação, mediada por um processo denominado de quimiotaxia. A quimiotaxia de leucócitos é o processo no qual há liberação de moléculas solúveis que atraem essas células, os chamados fatores quimiotáticos, entre os quais a IL-2, IL-5, IL-8 e RANTES (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; KELLY; HWANG; KUBES, 2007; SEGERER; SCHLÖNDORFF,

2007). Essas moléculas não servem apenas para direcionar o fluxo de células, como também recrutam os leucócitos específicos para o tecido inflamado, como os neutrófilos em resposta a uma inflamação bacteriana aguda e os eosinófilos em caso de alergia (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; KELLY; HWANG; KUBES, 2007).

A etapa seguinte de rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos para o sítio de inflamação é um processo mediado por diferentes famílias de moléculas de adesão, tais como: 1) Selectinas (P-selectina, expressa em plaquetas, L-selectina, expressa em leucócitos e E-selectina, expressa nas células endoteliais); 2) Integrinas, expressas em linfócitos (LFA-1 – *leukocyte function associated antigen*) e em macrófagos (Mac-1 – *macrophage-1 antigen*); 3) Superfamília das imunoglobulinas: molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1) (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; KELLY; HWANG; KUBES, 2007). Ao chegar ao local da inflamação, os leucócitos ativados liberam oxidantes, proteases e citocinas promovendo a fagocitose e a destruição do agente lesivo.

Os leucócitos são células essenciais para o sistema de defesa e estão divididos em diferentes subtipos celulares: mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) e polimorfonucleares. Estas células são responsáveis pela defesa do organismo contra microrganismos, fagocitando-os e destruindo-os de forma inespecífica, enquanto que os mononucleares do tipo linfócitos são os responsáveis pela resposta imune adaptativa.

Os monócitos circulantes representam cerca de 5 a 10% dos leucócitos totais, em humanos. A população de monócitos é altamente heterogênea, pois este tipo celular apresenta grande variação de marcadores de superfície, capacidade de fagocitose e potencial de diferenciação. Os monócitos são capazes de se diferenciar em uma variedade de fagócitos, incluindo macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, microglia, no sistema nervoso central, e células de Kupffer, no fígado (SETA; KUWANA, 2007).

Quando necessário, os monócitos circulantes no sangue migram para o tecido em resposta a um estímulo lesivo ou fatores quimiotáticos, onde então se transformam em macrófagos que fagocitam ativamente microrganismos, bem como células tumorais.

Os polimorfonucleares, também chamados de neutrófilos, são as primeiras e as mais abundantes células a chegar ao local da inflamação. Por isso, são reconhecidos como a primeira linha de defesa do organismo.

Os neutrófilos possuem o citoplasma repleto de grânulos, cujo conteúdo é constituído principalmente por peptídeos antimicrobianos e enzimas proteolíticas utilizadas para destruir e degradar os agentes estranhos. Tradicionalmente, os grânulos dos neutrófilos são classificados como peroxidase-positivos ou peroxidase-negativos de acordo com a presença ou não de mieloperoxidase. Os grânulos peroxidase-positivos são também chamados de grânulos primários ou azurófilos, já os peroxidase-negativos são também denominados de grânulos secundários ou específicos. Um terceiro tipo de grânulo dos neutrófilos é denominado grânulos terciários. Os grânulos azurófilos contêm proteases, enzimas hidrolíticas defensivas, peptídeos microbicidas e a mieloperoxidase (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007). Os grânulos específicos contêm, entre outros elementos, proteínas bactericidas como a lactoferrina e a lisozima, proteases como a colagenase e a gelatinase, além de suas membranas apresentarem receptores para substâncias quimiotáticas, como o TNF- α , e as moléculas de adesão do tipo CD11b/CD18, CD66 e CD67. Por outro lado, os grânulos terciários contêm as proteases do tipo gelatinase, arginases e metaloproteinases (MMP25), e as membranas apresentam o receptor CD11b/CD18 e CD67, essencial para a adesividade da célula no endotélio (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007). Os grânulos específicos sofrem degranulação tanto nas vesículas fagocíticas quanto no ambiente externo, destruindo os microrganismos ingeridos (SEELY; PASCUAL; CHRISTOU, 2003; BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007).

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase abundante nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, mas que também está presente nos monócitos, porém em menor quantidade (ARNHOLD, 2004). A MPO promove a liberação de espécies reativas de oxigênio a partir da conversão do oxigênio molecular em ânion superóxido, promovido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. A enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em

peróxido de hidrogênio, o qual possui ação microbicida. A reação subsequente é a reação entre o peróxido de hidrogênio e o ânion cloreto, para posterior formação de ácido hipocloroso, o qual também possui intensa atividade microbicida (ARATANI et al., 2004; ARNHOLD, 2004).

Em algumas situações, a MPO e o peróxido de hidrogênio podem ser liberados para fora da célula. Isso aumenta o potencial de destruição do alvo extracelular, mas também pode promover destruição tecidual no sítio inflamatório. Além disso, a liberação do ácido hipocloroso leva à formação de espécies reativas de oxigênio que também lesam o tecido. Níveis elevados de MPO são encontrados em pacientes com asma brônquica (EKMEKCI et al., 2004), no infarto do miocárdio e na aterosclerose (TSIMIKAS, 2006).

Outra enzima importante no processo inflamatório é a adenosina-deaminase (ADA). Esta é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas, catalizando a deaminação hidrolítica da adenosina ou 2-deoadenosina em inosina ou 2-deoxinosina e amônia. Trata-se de uma enzima liberada principalmente por linfócitos, monócitos e macrófagos durante o processo inflamatório, que regula os níveis plasmáticos de adenosina, a qual está associada diretamente com a resposta inflamatória e a liberação de citocinas (PACHECO et al., 2005). A atividade da ADA é o resultado da ação de suas duas isoformas: ADA1 e ADA2. ADA1 é uma enzima muito estudada e está relacionada com a proliferação e o crescimento de linfócitos, sendo que sua deficiência congênita resulta em uma severa síndrome de imunodeficiência, caracterizada pela ausência de linfócitos T e B funcionais (CONLON; LAW, 2004). Por outro lado, pouco se sabe sobre a estrutura e a regulação da isoforma ADA2, cujo papel fisiológico e patológico permanece pouco elucidado. Entretanto, níveis elevados de ADA2 são observados em diversas doenças, como meningite tuberculosa, em paciente HIV positivo, e tuberculose (CORRAL et al., 2004; LAMSAL et al., 2007). A adenosina é um mediador que pode apresentar atividade pró- ou antiinflamatória dependendo do tipo de receptor de adenosina ativado. Os receptores de adenosina pertencem à família de receptores acoplados a proteína G e são classificados em quatro diferentes subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, sendo a atividade antiinflamatória da adenosina mediada principalmente pela ativação do receptor A_{2A} (CARUSO; HOLGATE; POLOSA, 2006; SPICUZZA; DI MARIA; POLOSA, 2006).

O processo inflamatório também envolve uma série de mediadores, além de células e enzimas, responsáveis pelo desenvolvimento da resposta inflamatória. Dentre eles pode-se destacar o óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que regula funções celulares em condições fisiológicas e patológicas, incluindo o relaxamento vascular, a inibição da agregação plaquetária, a neurotransmissão, as atividades antimicrobiana e anti-tumoral dos macrófagos, entre outras (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; KOLIOS; VALATAS; WARD, 2004).

O NO é sintetizado a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina mediado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A oxidação da porção N-terminal do aminoácido libera NO e L-citrulina. Três isoformas de NOS já foram identificadas: duas delas são constitutivas e estão presentes nos tecidos neuronal (NOS_n) e endotelial (NOS_e) e são chamadas de NOS constitutivas (NOS_c), enquanto a terceira isoforma é expressa após indução por mediadores pró-inflamatórios, endotoxinas bacterianas entre outros, e é chamada de óxido nítrico sintase induzida (NOS_i) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

O processo de liberação do NO é o resultado de uma série de eventos oxidativos e redutores, envolvendo um grande número de cofatores. O NO gerado difunde-se pelas células e ativa a guanilato ciclase solúvel que, por sua vez, promove a formação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento da concentração de GMPc resulta no relaxamento das células musculares e na inibição da agregação plaquetária e na adesão dos leucócitos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; KOLIOS; VALATAS; WARD, 2004). Em processos infecciosos, a ação citotóxica do NO consiste principalmente na liberação de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, formando o peroxinitrito (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Em estados fisiológicos, o NO atua como agente protetor, mas quando é liberado em quantidades excessivas, pode contribuir para lesão tecidual. O NO está relacionado a diversas doenças, como artrite reumatóide, esclerose múltipla e sepse, condições nas quais o aumento na produção de NO promove lesão tecidual e contribui para a progressão da doença (JEAN-BAPTISTE, 2007; MOK et al., 2007; VUOLTEENAHO et al., 2007).

Além do óxido nítrico, outros mediadores são liberados durante o processo inflamatório, entre eles as citocinas e as quimiocinas. As citocinas são pequenas

proteínas de baixo peso molecular (8 a 40.000 daltons), produzidas e liberadas por diferentes células, tais como mastócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos, e estão envolvidas na quimiotaxia celular, na inflamação, no crescimento e na diferenciação celular, além do reparo e remodelamento tecidual, e na regulação da resposta imunológica (WONG; FISH, 2003; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Em geral, as citocinas possuem função antagônica e/ou pleiotrópica, ou seja, a mesma citocina pode ter efeitos opostos quando liberada por diferentes tipos de células ou quando agem em diferentes tipos de receptores celulares. Além disso, a síntese de citocinas pode ser influenciada por outras citocinas liberadas simultaneamente da mesma célula (efeito autócrino) ou de outras células alvo (efeito parácrino) (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

As citocinas se ligam a receptores específicos na célula alvo para promoverem o efeito biológico. Estes receptores estão localizados na membrana celular ou no citoplasma, e normalmente estão presentes em pequeno número (WONG; FISH, 2003).

Dentre as principais citocinas que participam ativamente do processo inflamatório destacam-se o TNF- α e a IL-1 β .

O TNF- α é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos e é considerada um dos principais mediadores da inflamação (BLOEMEN et al., 2007; TILG; MOSCHEN; KASER, 2007). Trata-se de uma das principais citocinas associadas a doenças inflamatórias, dentre elas a artrite reumatóide, a asma brônquica e a colite ulcerativa (WILLIAMS, 2006; BLOEMEN et al., 2007; OLSEN et al., 2007). Mesmo em baixas concentrações, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas (BLOEMEN et al., 2007). Além disso, o TNF- α é um dos principais reguladores da produção e liberação de IL-1 β , outra importante citocina pró-inflamatória (SASAKAWA et al., 2005).

A família da Interleucina-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra) desempenha um importante papel no desenvolvimento da resposta imune e do processo inflamatório através da indução da expressão de outras citocinas e quimiocinas, além de aumentar a formação de eicosanóides como a prostaglandina E₂, a expressão de NOS_i e de metaloproteinases (BARKSBY et al., 2007; JACQUES et al., 2006).

A IL-1 β é a principal citocina envolvida na inflamação. Este mediador é sintetizado principalmente por monócitos e macrófagos (BARKSBY et al., 2007). A IL-1 β age sinergicamente com TNF- α ativando a resposta inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos e promovendo a diapedese leucocitária na resposta inflamatória aguda (BARKSBY et al., 2007). Além disso, a IL-1 β está associada a doenças de caráter inflamatório, como a artrite reumatóide (JACQUES et al., 2006), a doença pulmonar obstrutiva crônica (CHUNG, 2005;), a sepse (BOZZA et al., 2007) e a pielonefrite (SHEU et al., 2007).

A família das quimiocinas é composta por citocinas quimiotáticas que regulam a migração de leucócitos através da interação com receptores que estão acoplados a proteína G (ROSTÈNE; KITABGI, 2007). As quemocinas são classificadas em quatro diferentes subfamílias: CXC, CC, C, CX₃C, sendo as subfamílias CXC e CC as principais envolvidas no processo inflamatório. As quemocinas CXC estão diretamente envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos, linfócitos T e B e células *Natural Killer*, enquanto as quemocinas CC regulam a migração de monócitos, macrófagos, basófilos, linfócitos T e eosinófilos (ROSTÈNE; KITABGI, 2007; ZEREMSKI; PETROVIC; TALAL, 2007). Estudos experimentais têm demonstrado a participação das quemocinas no desenvolvimento da resposta inflamatória, como na fibrose pulmonar (KAI et al., 2007), aterosclerose (LIN et al., 2007), artrite (FERRANDI et al., 2007) e sepse (GUO et al., 2006). Por outro lado, outros estudos têm evidenciado o envolvimento dessas quemocinas com diferentes doenças, como asma (WARK et al., 2007), câncer colorretal (RUBIE et al., 2007) e artrite reumatóide (DESMETZ et al., 2007).

Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos antiinflamatórios não-estereóides (AINEs).

Os glicocorticóides, como a dexametasona, são fármacos que possuem efeitos antiinflamatórios e imunossupressores. O mecanismo de ação destes fármacos depende da interação com receptores intracelulares (complexos esteróides) que resulta na indução da síntese de proteínas, como a lipocortina-1. Os glicocorticóides também promovem a inibição da ação de fatores de transcrição

como AP-1 e NF- κ B, resultando na supressão da transcrição de genes da COX-2 e de interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α) (TAMAOKI et al., 2008).

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs), como a indometacina, são fármacos que possuem efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético. O mecanismo de ação destes fármacos consiste na inibição da ciclooxigenase (COX), e, portanto, inibição da produção de prostaglandinas (PGE₂, PGI₂) e tromboxanos (KAPUR; CHANG, 2007).

1.3 MODELO DE INFLAMAÇÃO

Diversos modelos animais de inflamação são utilizados para avaliar a eficácia de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias ou mesmo estudar o mecanismo de ação de medicamentos já utilizados na clínica, mas que não tem o mecanismo de ação farmacológica ainda totalmente esclarecido. Isto se deve ao fato que, apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, a etiologia e as manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de modelos específicos que reproduzam as características básicas. Desta forma é fácil compreender também porque o tratamento de doenças inflamatórias é bastante diversificado.

Esforços são realizados no sentido de se identificar modelos experimentais apropriados para cada tipo de reação inflamatória, como asma brônquica, artrite reumatóide e colite ulcerativa, entre muitos outros. Protocolos experimentais onde o processo inflamatório é induzido agudamente são utilizados para estudos desta reação abordando, entre outros, a participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares, além de possibilitar a triagem de fármacos com potencial ação antiinflamatória.

A bolsa de ar no dorso, também conhecida como *air pouch*, é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação antiinflamatório. Esta técnica é de fácil execução e permite a avaliação de diversos parâmetros inflamatórios como, por exemplo, estudo da celularidade, exsudação, além de mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico (NO), mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA)). O modelo da bolsa de ar é o modelo animal que mimetiza a artrite reumatóide. Neste modelo, a indução da inflamação pela

carragenina na bolsa de ar subcutânea forma uma membrana com características semelhantes à membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatóide. A introdução da carragenina induz um processo inflamatório com as mesmas características e curso da inflamação observada na artrite reumatóide, com infiltração de polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios (SEDGWICK; LEES, 1986).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiinflamatória do tacrolimus no modelo da bolsa de ar induzido pela carragenina, em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o efeito antiinflamatório do tacrolimus sobre a migração dos leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) e a exsudação no lavado da bolsa de ar de animais tratados com carragenina.

- II. Investigar o efeito do tacrolimus sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) e da adenosina-deaminase (ADA), bem como a concentração de nitrito/nitrato (NO^x) e níveis de fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), de interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e da quemocina para neutrófilos (KC).

3 ARTIGO PUBLICADO

Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch

Silvana Virginia Gagliotti Vigil¹, Rafael de Liz¹ Yara Santos Medeiros² and Tânia Silvia Fröde^{1*}

¹Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

²Department of Pharmacology, Center of Biological Science, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88049-900, Florianópolis, SC, Brazil.

* Corresponding author: Tel.: +55 48 99614846, Fax: +55 48 32440936.

E-mail address: saleh@ccs.ufsc.br or taniafrode@zipmail.com.br (T. S. Fröde).

Abstract

Background: Tacrolimus (Tac) is a macrolide immunosuppressant drug isolated from *Streptomyces tsukubaensis*, widely used in organ transplantation.

Objective: This study examined the effect of tacrolimus administered by oral route (p.o.) on inflammation in mouse subcutaneous air pouch triggered by carrageenan (Cg 1%).

Methods: The air pouch was induced as described by Benincá et al., 2007. The inflammatory parameters (leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities, as well as nitrate/nitrite concentrations (NO^x), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), chemokine to neutrophil (KC) and tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) levels were analysed 24 h after injection of carrageenan.

Results: Tacrolimus, indomethacin and dexamethasone significantly inhibited leukocytes, neutrophils and exudation ($P < 0.05$) when they were administered 0.5 h before inflammation. These drugs, under the same conditions, decreased MPO and ADA activities ($P < 0.05$), NO^x and $\text{IL-1}\beta$ levels ($P < 0.01$). Tacrolimus and indomethacin, but not dexamethasone, inhibited KC levels ($P < 0.01$). On the other hand, tacrolimus and dexamethasone, but not indomethacin, decreased $\text{TNF-}\alpha$ levels ($P < 0.01$).

Conclusions: Results of this study indicate that tacrolimus has an important anti-inflammatory property, showing not only inhibition of proinflammatory mediators release, but also inhibition of activated leukocyte infiltration into the site of inflammation. Furthermore, these results showed that most of the anti-inflammatory actions of tacrolimus were similar to those observed in animals treated with either indomethacin or dexamethasone.

Keywords: Tacrolimus; Anti-inflammatory activity; Cytokines; Enzymes; Leukocytes; Exudation.

1. Introduction

Tacrolimus formerly FK506 is a natural antifungal macrolide immunosuppressant drug isolated from *Streptomyces tsukubaensis* [1], which is widely used in organ transplantation [2, 3, 4], and to treat atopic dermatitis [5], psoriasis [6] and bowel disease [7]. Clinical studies have also demonstrated the efficacy of tacrolimus in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) [8, 9].

Tacrolimus exerts its immunosuppressive effects primarily by interfering with the activation of T cells [10, 11]. Its mechanism of action is linked to the binding of intracellular proteins called immunophilins (FKBP-12) forming a tacrolimus-FKBP-12 complex. This complex promotes the inhibition of calcineurin phosphatase, an enzyme involved in activation of the nuclear factor of activated T cells (NF-AT), a transcription factor required for expression of cytokine genes in T cells. This results in a complete blockage of the production of T cell-derived cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ [10]. Another calcineurin inhibitor, cyclosporine A (CsA), exerts similar inhibitory effects on inflammatory cytokine, although the inhibitory effect of CsA is less potent than that of tacrolimus [12]. Additionally, inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor, interleukin-1 beta (IL-1 β), and interleukin-8 (IL-8), and other mediators such as nitric oxide (NO), as well as pro-inflammatory enzymes such as myeloperoxidase (MPO) and adenosine deaminase (ADA) are, in part, involved in the inflammatory response and they are the target of studies on drugs that have anti-inflammatory properties, such tacrolimus. Previous data obtained in our laboratory [13] revealed that tacrolimus administered systemically exerted important anti-inflammatory effects by inhibiting leukocytes and proinflammatory mediators in a murine model of pleurisy induced by carrageenan.

2. Objectives

This study was designed to examine the effect of tacrolimus administered by oral route (p.o) on acute inflammation in a murine model compared to those obtained with classical non-steroidal and steroidal anti-inflammatory drugs (indomethacin and

dexamethasone). Specifically, we evaluated the effect of this drug on inflammation induced by carrageenan, in the air pouch model.

3. Materials and methods

3.1. Animals

Swiss mice, weighing 18–22 g, were housed under standardized conditions (room at constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with alternating 12 h periods of light and darkness and humidity (50-60%)) and fed a standard mouse diet with water *ad libitum* before use. All experiments were in agreement with guidelines on ethical standards of investigation of experimental procedures in animals [14]. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research (CEUA of our university, protocol number 23080.007040/2006-39) and performed in accordance with norms of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

3.2. Experimental protocol

In this experimental protocol, different groups of animals received air injection (1.5 ml) on three alternate days to induce the air pouch. On the sixth day animals received carrageenan (Cg: 1%) administered by subcutaneous route (s.c.) and 24 h later animals were killed by an overdose of ether [15]. Animals were fixed on a surgical table and an incision in the dorsal skin was made perforating the air pouch. The cavity was washed with 1.0 ml of sterile PBS (pH 7.6, composition mmol/L: NaCl 137, KCl 2.7 and phosphate buffer salts 10) containing heparin (20 IU/ml) [15]. Cell migration, exudation, MPO and ADA activities, as well as NO^x , IL-1 β , KC and TNF- α levels were evaluated 24 h after phlogogen administration. Indomethacin (5.0 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg) administered by intraperitoneal route (i.p.) 0.5 h before inflammation were used as reference drugs [13, 15].

Initially, to establish a standard for the tacrolimus, together with doses and time periods to be used in the experiments, different groups of animals were treated (0.5 h before Cg) with different doses of tacrolimus (1.0 to 10.0 mg/kg) administered 0.5 h (p.o.) before Cg or treated with sterile saline (NaCl 0.9 %) administered by

subcutaneous route (s.c.), and the inflammatory parameters (cell migration and exudation) were analyzed 24 h after carrageenan injection. In another set of experiments, animals were pretreated with tacrolimus (2.0 mg/kg, p.o.), at different time points (0.5 - 4 h) and the same inflammatory parameters were evaluated 24 h after carrageenan-induced inflammation. According to this protocol, 2.0 mg/kg of tacrolimus was selected in the experiments to analyse its effects on MPO and ADA activities, as well as on NO^x, IL-1 β , KC and TNF- α levels.

3.3. Quantification of cell migration and exudation

After killing animals with an overdose of ether, samples from the air pouch exudate were collected for determinations of total and differential leukocytes. Total leukocyte counts were performed in a Neubauer chamber diluting the exudate in Türk solution (1:20), and cytopspin preparations of exudate were stained with May-Grünwald-Giemsa for the differential leukocyte counts, which were performed under an oil immersion objective [15].

To evaluate the degree of exudation, animals were previously challenged with a solution of Evans blue dye (25.0 mg/kg) administered by intravenous route (i.v.), 5 min after treatment with carrageenan [15]. The amount of dye was estimated by colourimetry using an Elisa plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) at 600 nm, by interpolation from a standard curve of Evans blue dye in the range of 0.01 to 50.0 μ g/ml.

3.4. Quantification of nitrate/nitrite concentrations

Nitric oxide was measured as its breakdown product of nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) using the Griess method [16]. Samples of the air pouch cavity lavage obtained from control and treated animals that did not receive Evans blue dye injection were separated and stocked at -70^oC. On the day of the experiments, the samples were thawed and deproteinized by the addition of 6 mM sodium hydroxide and 0.6% of zinc sulfate. Afterwards, 250 μ l of air pouch cavity lavage was diluted in 30 μ l of ammonium format, 30 μ l of hydrated disodium hydrogen phosphate-12 and 30

μl of *Escherichia coli* (EC ATCC 25922: diluted (1:10) in PBS), and then the mixture was incubated for 2 h at 37°C . After centrifugation at $50 \times g$ for 5 min, 250 μl of the supernatant was transferred to cuvettes and the same volume of fresh Griess reagent (5% (vol./vol.) of H_3PO_4 , 1% of sulfanilic acid and 0.1% of N-(1-naphthyl) ethylenediamine) was added and incubated for 10 min at room temperature. The reaction of NO_2^- with this reagent produces a pink color, which was quantified at 543 nm against standards (0 - 150 μM) on a spectrophotometer Hitachi U2001, model 121-0031 (Tokyo, Japan) [17]. Results were expressed as μM .

3.5. Quantification of myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities

In-house assays of both myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities were employed according to the methods described in the literature [18, 19]. Using conventional reagents, the concentration of each enzyme was estimated by means of colourimetric measurements (absorbances of 450 and 620 nm, respectively) with an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA). Results were expressed as mU/ml (MPO) and U/l (ADA).

3.6. Quantification of IL-1 β , TNF- α and KC levels

Samples of exudate were collected and immediately prepared for the analysis of cytokine levels. In this protocol, commercially available kits were used with specific antibodies for each cytokine. The cytokine levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions. When necessary the fluid exudate samples were diluted 1:3 or 1:10 with specific diluents (buffered with 0.09% sodium azide for TNF- α or buffer diluent with 1% bovine serum albumin (BSA) plus 0.05% Tween 20 in PBS for KC) to determine the TNF- α and KC levels, respectively. The range of values detected by these assays was: IL-1 β (100.0 - 6400.0 pg/ml), KC (23.4 - 1500.0 pg/ml) and TNF- α (5.0 - 2000.0 pg/ml). The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) for IL-1 β , KC and TNF- α were: intra CV: IL-1 β : = $6.2 \pm 0.4\%$, KC = $9.7 \pm 0.9\%$ and TNF- α = $7.8 \pm$

0.9%, inter CV: IL-1 β = 5.1 \pm 0.6%, KC = 4.1 \pm 0.9% and TNF- α = 9.6 \pm 2.2%, with sensitivity values of IL-1 β = 1.7 pg/ml, KC = 23.4 pg/ml and TNF- α = 5.0 pg/ml. All cytokine levels were estimated by means of colourimetric measurement at 450 nm with an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) by interpolation from a standard curve.

3.7. Drugs

The following drugs and reagents were used: tacrolimus (Prograf, Fujisawa Ireland Ltd., Killorgin, Ireland), dexamethasone (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brazil), carrageenan (degree IV), human neutrophil myeloperoxidase, indomethacin, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of rat IL-1 β , mouse KC (IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka, Gunma, Japan) and mouse TNF- α (BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), Evans Blue and May-Grunwald Giemsa dyes (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brazil). Others reagents used were of analytical grade and were obtained from different commercial sources.

3.8. Statistical analysis

Data is reported as the mean \pm SEM. Significant differences between groups were determined by Student's t test and analysis of variance (ANOVA) complemented with Dunnett's test when necessary. $P < 0.05$ was considered as indicative of significance.

4. Results

4.1. Effects of tacrolimus, indomethacin and dexamethasone on cellular infiltration and exudation

Analysis of the inhibitory profile with the studied doses of tacrolimus (2.0 to 10 mg/kg,) indicated that this effect was not dose-dependent since maximal effect was obtained with the dose of 2.0 mg/kg (leukocyte migration (% of inhibition: 89.6 ± 1.1 %) ($P < 0.01$), neutrophils (% of inhibition: 93.0 ± 0.4 %) ($P < 0.01$) and exudation (% of inhibition: 47.2 ± 1.9) ($P < 0.01$)) (Table 1). This drug did not modify the mononuclear cells ($P > 0.05$) (Table 1).

In the time course profile study, results showed that tacrolimus (2.0 mg/kg, p.o.), significantly decreased leukocytes, neutrophils and exudation when it was administered only 0.5 h before carrageenan ($P < 0.01$) (results not shown).

As expected indomethacin and dexamethasone used as a reference drugs at doses of 5.0 and 0.5 mg/kg, respectively administered by intraperitoneal route (i.p.) 0.5 h before Cg caused a significant inhibition of leukocytes, neutrophils and exudation ($P < 0.01$) (Table 1).

4.2. Effects of tacrolimus, indomethacin and dexamethasone on myeloperoxidase, adenosine-deaminase activities and nitrate/nitrite concentrations

Tacrolimus (2.0 mg/kg), indomethacin (5.0 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg) caused a marked reduction in MPO and ADA activities and NO^x (tacrolimus: % of inhibition: MPO: 30.1 ± 5.2 , ADA: 44.7 ± 4.7 and NO^x : 53.6 ± 3.8) ($P < 0.01$), (indomethacin: % of inhibition: MPO: 31.7 ± 1.2 , ADA: 13.0 ± 6.5 and NO^x : 34.9 ± 8.0) ($P < 0.05$) and (dexamethasone: % of inhibition: MPO: 69.5 ± 3.1 , ADA: 70.7 ± 5.5 and NO^x : 58.9 ± 2.9) ($P < 0.01$) (Table 2).

4.3. Effects of tacrolimus, indomethacin and dexamethasone on cytokine levels

In this protocol, tacrolimus (2.0 mg/kg), indomethacin (5.0 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg), significantly decreased IL- 1β levels (% of inhibition: tacrolimus: 54.3 ± 10.8 , indomethacin: 68.7 ± 14.4 and dexamethasone: 98.8 ± 0.25) ($P < 0.01$) (Table 2). Furthermore, tacrolimus and indomethacin, but not dexamethasone, inhibited KC levels (% of inhibition: tacrolimus: 71.3 ± 2.5 and indomethacin: 69.3 ± 4.1) ($P < 0.01$) (Table 2). On the other hand, tacrolimus and

dexamethasone, but not indomethacin, inhibited TNF- α level (% of inhibition: tacrolimus: 60.8 ± 5.9 and dexamethasone: 47.0 ± 3.4) ($P < 0.01$) (Table 2).

5. Discussion

Our study in the mouse air pouch induced by carrageenan demonstrated that tacrolimus presented important anti-inflammatory activities which were more pronounced at the level of cell migration, as well as in the content of proinflammatory mediators, such as NO^x, TNF- α , IL-1 β and KC levels, and MPO and ADA activities. Results of the study here reported are in agreement with those of others studies [11] including prior report from our laboratory [13] and extends the evidence that this drug may exert anti-rheumatic effects due to its potential to down regulate proinflammatory cytokines.

Tacrolimus, cyclosporine and sirolimus belong to the class of immunosuppressant agents that have been used widely in organ transplantation and more recently in autoimmune diseases [8, 9, 20]. Furthermore, experimental studies suggest that this drug is also effective in inhibiting inflammation in several experimental models not directly related to autoimmune basis. However, whereas some studies presented only results regarding inhibition of cell migration (chronic colitis, leukocyte infiltration into the airways of ovalbumin-challenged guinea-pigs [21, 22, 23] by either evaluating cell migration content [22, 23] or measuring enzyme activities (MPO) [21] released by activated leucocytes in the site of inflammation, the present work (mouse air pouch model) and prior study (mouse pleurisy) from our laboratory [13] provide unique opportunities to evaluate both cell migration and exudation following acute administration of tacrolimus either by systemic or oral routes. Although the profile of each animal model and experimental designs were quite different, both parameters were significantly inhibited and are in agreement with those reported by Whooley et al (2004) that have also demonstrated that tacrolimus inhibited both cell migration and fluid leakage in an experimental model of lung ischemia-reperfusion [24]. Another point to consider is that the air pouch model has been reported to have histological similarity to synovial membranes and when challenged via an injection of carrageenan the inflammatory reaction is histologically similar to that observed in the chronic synovial inflammation [25]. Thus, in the present

study the reduction in exudation induced by tacrolimus is, in part, in agreement with the studies of Magari et al (2003) in an animal model of rheumatoid arthritis induced by adjuvant and supports its role as an analgesic agent [26].

This study also confirms that the pre-treatment of the animals with tacrolimus inhibits the production of pro-inflammatory cytokines like TNF- α and IL-1 β that play joint injury by inducing activation and recruitment of leukocytes and exudation at the site of inflammation in experimental model of arthritis [27]. The same inhibitory effect was observed in the model of arthritis induced by collagen or adjuvant in rats, where TNF- α and IL-1 β levels were inhibited [26, 28], including also the decrease of nuclear-factor kappa beta activation [23]. On the other hand, chemokines such as KC which are responsible for the chemotaxis of leukocytes from blood to inflamed tissues [29] were also inhibited. Altogether, the findings that tacrolimus significant inhibited TNF- α , IL-1 β and KC levels at the site of inflammation suggests that it is occurring a down regulation of cellular adhesion molecules expression that is a key factor to recruit further leukocytes.

In line with the comments above, it has also been demonstrated that tacrolimus also inhibited the expression of inducible NO-synthase [30], which explains the significant reduction of NO^x at the site of inflammation. Other studies have led to similar results, such as that observed by us in a murine model of pleurisy [13] and by Strestikova et al. (2001) who demonstrated that tacrolimus reduced the LPS-induced NO^x production in a dependent manner in macrophage cells in rats [30].

It is interesting to comment that the inhibitory properties presented by the studied calcineurin inhibitor in this work presented similarities with the anti-inflammatory effects produced by indomethacin and dexamethasone. These drugs were effective in inhibiting cell migration, NO^x, MPO and ADA activities and IL-1 β levels. Fluid leakage was inhibited by tacrolimus, dexamethasone and indomethacin. Although all drugs inhibited IL-1 β , dexamethasone and indomethacin inhibited TNF- α and KC, respectively. However, limitations in the experimental design including pharmacokinetics, peak of action and mechanism of action, among others restrict adequate comparisons of these findings.

Another important fact to comment is that tacrolimus in the air pouch model at dose of 1.0 mg/kg had no effect and increasing dosages have declining, but significant effects upon leukocyte migration, neutrophils and exudation. According to

these data, it is possible to speculate that tacrolimus has a “narrow inhibitory window” since the dose of 2.0 mg/kg caused $89.6 \pm 1.1\%$ and $47.2 \pm 1.9\%$ inhibitory effects upon either cell migration and exudation, respectively, whereas higher doses did not present the same efficacy. This property is common to immunosuppressive drugs, a characteristic that limits both their use and duration of therapy in humans [8].

To conclude, it is suggested that the efficacy of tacrolimus as an anti-inflammatory drug promoting inhibition of cell influx and exudation to the site of the inflammatory response caused by carrageenan is certainly related to the inhibition of $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, KC levels and NO^x . Furthermore, these results showed that most of the anti-inflammatory actions of tacrolimus present some similarities to those observed in animals treated with indomethacin or dexamethasone, suggesting that these drugs may have a common via of anti-inflammatory action. These results also indicate that other studies must be done to clarify the mechanisms of action of tacrolimus prior the analysis of the effect of this drug upon mRNA for pro-inflammatory cytokines, as well as inhibition of nuclear factors transcription such as NF-kappa B and AP-1. Further, other studies should be done to explore its possible effects upon apoptosis pathways.

References

- [1] Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot* 1987; 40(9); 1249-55.
- [2] Bush EL, Lin SS. Lung transplantation: advances in immunosuppression. *Thorac Surg Clin* 2006; 16(4); 421-33.
- [3] McCormack PL, Keating GM. Tacrolimus: in heart transplant recipients. *Drugs* 2006; 66(17); 2269-79.
- [4] Wente MN, Sauer P, Mehrabi A, Weitz J, Buchler MW, Schmidt J, Schemmer P. Review of the clinical experience with a modified release form of tacrolimus [FK506E (MR4)] in transplantation. *Clin Transplant* 2006; 20(17); 80-4.
- [5] Nakagawa H. Comparison of the efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment with topical corticosteroids in adult patients with atopic dermatitis: review of randomised, double-blind clinical studies conducted in Japan. *Clin Drug Investig* 2006; 26(5); 235-46.
- [6] Ezquerro GM, Regana MS, Acosta EH, Millet PU. Topical tacrolimus for the treatment of psoriasis on the face, genitalia, intertriginous areas and corporal plaques. *J Drugs Dermatol* 2006; 5(4); 334-36.
- [7] Gonzalez-Lama Y, Gisbert JP, Mate J. The role of tacrolimus in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Dig Dis Sci* 2006; 51(10); 1833-40.
- [8] Yocum DE, Furst DE, Kaine JL, Baldassare AR, Stevenson JT, Borton MA, Mengle-Gaw LJ, Schwartz BD, Wisemandle W, Mekki QA. Efficacy and safety of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind trial. *Arthritis Rheum* 2003; 48(12); 3328-37.
- [9] Kitahara K, Kawai S. Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19(3); 238-45.
- [10] Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan P. Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(20); 7554-59.
- [11] Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 2005; 54(1); 1-9.

- [12] Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, Malthaner R, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 18(4); 5161.
- [13] Pereira R, Medeiros YS, Fröde TS. Antiinflammatory effects of tacrolimus in a mouse model of pleurisy. *Transpl Immunol* 2006; 16(2); 105-11.
- [14] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16(2); 109-10.
- [15] Benincá JP, Montanher AB, Zucolotto SM, Schenkel EP, Fröde TS. Anti-inflammatory effects of the *Passiflora edulis*: forma *flavicarpa* Degener inhibition of leukocytes, enzymes and pro-inflammatory cytokine levels in the air pouch model, in mice. *Food Chem* 2007; 104(3); 1097-105.
- [16] Green IC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SB. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1); 131-38.
- [17] Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 1999; 20(8); 949-56.
- [18] Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)- and tetradecanoylphorbol acetate (tpa)- induced dermal inflammation. *Inflammation* 1993; 17(6); 723-41.
- [19] Giusti, G, Galanti, B. Adenosine deaminase: colourimetric method. In Bergmeyer, HU, ed. *Methods of enzymatic analyses*. Weinheim, Verlag Chemie, 1984; 315-23.
- [20] Rolla G, Ferrero N, Bergia R, Guida G. Perspectives in clinical immunology. *Recenti Prog Med* 2006; 97(12); 787-96.
- [21] Aiko S, Conner EM, Fuseler JA, Grisham MB. Effects of cyclosporine or FK506 in chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280(2); 1075-84.
- [22] Lapa e Silva JR, Ruffi  C, Lefort J, Nahori MA, Vargaftig BB, Pretolani M. Prevention of antigen-induced bronchial hyperreactivity and airway inflammation in sensitized guinea-pigs by tacrolimus. *Mediators Inflamm* 1999; 8(1); 17-23.
- [23] Morishita Y, Hirayama Y, Miyayasu K, Tabata K, Kawamura A, Ohkubo Y, Mutoh

S. FK506 aerosol locally inhibits antigen-induced airway inflammation in Guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136(4); 372-78.

[24] Woolley SM, Farivar AS, Naidu BV, Rosengart M, Thomas R, Fraga C, Mulligan MS. Endotracheal calcineurin inhibition ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127(2); 376-84.

[25] Sedgwick AD, Lees P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acutecarrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions* 1986; 18(3-4); 439-46.

[26] Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S, Goto T. Calcineurin inhibitors exert rapid reduction of inflammatory pain in rat adjuvant-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 2003; 139(5); 927-34.

[27] Bressan E, Cunha FQ, Tonussi CR. Contribution of TNF-alpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, oedema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. *Cytokine* 2006; 36(1-2); 83-9.

[28] Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. Inflammatory cytokine levels in paw tissues during development of rat collagen-induced arthritis: effect of FK506, an inhibitor of T cell activation. *Inflamm Res* 2004; 53(9); 469-74.

[29] Tateda K, Moore TA, Newstead MW, Tsai WC, Zeng X, Deng JC, Chen G, Reddy R, Yamaguchi K, Standiford TJ. Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *legionella pneumonia*: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infect Immun* 2001; 69(4); 2017-24.

[30] Strestikova P, Otova B, Filipec M, Masek K, Farghali H. Different mechanisms in inhibition of rat macrophage nitric oxide synthase expression by FK 506 and cyclosporin A. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23(1); 67-74.

Table 1 – Effects of tacrolimus, indomethacin and dexamethasone on cell migration and exudation on inflammation induced by carrageenan in the murine air pouch model.

Groups/doses	Leukocytes (x10⁶)	Neutrophils (x10⁶)	Mononuclear cells (x10⁶)	Exudate (µg/ml)
C ^a	7.9 ± 0.2	7.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	12.9 ± 1.0
Tac (1.0 mg/kg) ^b	7.2 ± 0.4	6.4 ± 0.3*	0.8 ± 0.3	12.9 ± 0.6
Tac (2.0 mg/kg) ^b	0.8 ± 0.1**	0.4 ± 0.2**	0.4 ± 0.1	6.8 ± 0.2**
Tac (5.0 mg/kg) ^b	2.3 ± 0.2**	1.5 ± 0.3**	0.8 ± 0.1	9.7 ± 0.5**
Tac (10.0 mg/kg) ^b	5.2 ± 0.5**	4.5 ± 0.4**	0.7 ± 0.1	12.3 ± 0.8
Indo (5.0 mg/kg) ^c	2.7 ± 0.3**	2.0 ± 0.4**	0.7 ± 0.2	7.9 ± 0.8**
Dexa (0.5 mg/kg) ^c	3.8 ± 0.2**	2.9 ± 0.2**	0.9 ± 0.1	9.3 ± 1.1**

Tac = tacrolimus (1.0-10.0 mg/kg) administered in different groups of animals 0.5 h before inflammation induced by carrageenan. C = control = responses in animals treated only with carrageenan (1%). Indo = responses in animals pretreated with indomethacin (5.0 mg/kg, i.p.). Dexa = responses in animals pretreated with dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.).

* P < 0.05 and ** P < 0.01. a = administered by subcutaneous route; b = administered by oral route and c = administered by intraperitoneal route. N = 5 animals.

Table 2 – Effects of tacrolimus, indomethacin and dexamethasone upon MPO, ADA activities, and NO, IL-1 β , KC and TNF- α levels on inflammation induced by carrageenan in the murine air pouch model

Groups/doses	MPO (mU/ml)	ADA (U/l)	NO (μM)	IL-1β (pg/ml)	KC (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
C ^a	372.5 \pm 18.3	44.6 \pm 1.8	12.7 \pm 0.2	2066.0 \pm 4.0	40590.0 \pm 3539.0	5283.0 \pm 529.1
Tac (2 mg/kg) ^b	260.3 \pm 19.5 ^{**}	24.6 \pm 2.1 ^{**}	5.9 \pm 0.5 ^{**}	944.2 \pm 222.9 ^{**}	11630.0 \pm 1005.0 ^{**}	2069.0 \pm 311.1 ^{**}
Indo (5 mg/kg) ^c	254.4 \pm 4.4 ^{**}	38.8 \pm 2.9 [*]	8.2 \pm 1.0 ^{**}	645.9 \pm 297.3 ^{**}	12460.0 \pm 1679.0 ^{**}	5225.0 \pm 325.4
Dexa (0.5 mg/kg) ^c	113.9 \pm 11.7 ^{**}	13.1 \pm 2.4 ^{**}	5.2 \pm 0.4 ^{**}	24.3 \pm 5.8 ^{**}	44830.0 \pm 412.5	2799.0 \pm 179.9 ^{**}

Tac = tacrolimus (2.0 mg/kg) administered in different groups of animals 0.5 h before the inflammation induced by carrageenan. C = control = responses in animals treated only with carrageenan (1%). Indo = responses in animals pretreated with indomethacin (5.0 mg/kg, i.p.). Dexa = responses in animals pretreated with dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.). * P < 0.05 and ** P < 0.01. a = administered by subcutaneous route; b = administered by oral route and c = administered by intraperitoneal route N = 5 animals.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o efeito do tacrolimus administrado por via oral sobre a quimiotaxia de leucócitos, formação de exsudato e produção e/ou liberação de mediadores pró-inflamatórios solúveis, tais como TNF- α , IL-1 β , KC e NO. Neste mesmo estudo ainda avaliamos o efeito do tacrolimus sobre a liberação de enzimas pró-inflamatórias como a MPO e a ADA.

Estes resultados demonstraram que o tacrolimus apresentou importante atividade antiinflamatória, caracterizada pela diminuição de: exsudato, número de células infiltradas, especialmente de neutrófilos, e a redução da produção e/ou liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-1 β , KC e NO. Resultados semelhantes foram observados com o tratamento dos animais com indometacina ou dexametasona.

As citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β estão envolvidos na lesão tecidual, uma vez que promovem a ativação e o recrutamento de leucócitos, além da formação de exsudato no sítio da inflamação. Exemplo deste fato são aqueles descritos por Bressan et al., (2006) pelo qual demonstraram que a injeção intra-articular de anticorpo anti-TNF- α ou anti-IL-1 β reduziu a formação de edema e a infiltração de células na articulação do joelho de ratos, no modelo experimental de artrite induzida por carragenina e lipopolissacarídeo (LPS). Já, Nakae et al., (2007) avaliaram a participação do TNF- α no desenvolvimento da resposta inflamatória nos pulmões de camundongos sensibilizados com ovalbumina. Os resultados demonstraram que animais deficientes de TNF- α apresentaram diminuição da infiltração de neutrófilos nos pulmões, além de níveis reduzidos de mieloperoxidase e de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-4, IL-5 e IL-17 no lavado broncoalveolar, quando comparados com o grupo controle. Barsante et al., (2007) demonstraram ainda que a administração oral de DF 2162, um inibidor de receptores para quemoquinas da família CXC (CXCR1/2), ou anticorpo anti-TNF- α , inibiu a infiltração de neutrófilos na articulação tíbio-tarsal e o edema na pata, na artrite induzida por injeção subcutânea de *Mycobacterium butyricum*, em ratos.

Outros estudos, utilizando diferentes modelos de inflamação, têm demonstrado a participação do TNF- α na amplificação do processo inflamatório.

Kumar et al., (2007) observaram que, ao incubar TNF- α em uma cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano tratadas com piperina, um inibidor de

TNF- α , houve inibição da expressão de moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina.

Além de indução da quimiotaxia de neutrófilos e formação de edema, o TNF- α ainda induz a produção e/ou liberação de IL-1 β . Exemplo deste fato são aqueles demonstrados pelo estudo desenvolvido por Cho et al., (2007) no qual foi observado a inibição da liberação de IL-1 β por células HaCAT induzidas com TNF- α *in vitro*, quando as mesmas foram tratadas com curcumina, um inibidor de NF- κ B.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória secretada por diferentes células, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas, queratinócitos e fibroblastos, e desempenha um importante papel no desenvolvimento do processo inflamatório e na defesa do hospedeiro (BARKSBY et al., 2007). A participação da IL-1 β no processo inflamatório é amplamente estudada. Yamamoto et al., (2007) demonstraram que a administração endovenosa de lipopolissacarídeo (LPS) promoveu aumento dos níveis de IL-1 β no soro de camundongos. Frank et al., (2007) avaliaram o efeito da administração endovenosa do antagonista natural do receptor de IL-1 β (IL-1Ra) sobre o desenvolvimento da inflamação pulmonar induzida por ventilação mecânica, em camundongos. Os resultados demonstraram inibição da infiltração de neutrófilos e da formação de edema nos pulmões de camundongos. Em outros estudos, McColl et al., (2007) demonstraram que a administração intraperitoneal de IL-1 β potencializou a inflamação induzida por LPS, administrado por via intraperitoneal, aumentando a formação de edema, a infiltração de neutrófilos e os níveis de KC e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) no cérebro de ratos, no modelo de isquemia cerebral induzida por obstrução da artéria cerebral média.

Outros estudos, como o desenvolvido por Zwerina et al., (2007), observaram que a da IL-1 β está envolvida no processo de erosão óssea, inflamação da cartilagem e formação de osteoclastos, no modelo de artrite induzida por TNF- α , em camundongos.

A quimiotaxia leucocitária está intimamente relacionada à liberação de citocinas específicas que promovem a migração de leucócitos. Dentre estas podemos destacar as quemocinas para neutrófilos (KC). Estudos desenvolvidos por Tateda et al., (2001) demonstraram que a inoculação intratraqueal de *Legionella pneumophila* promoveu o aumento da infiltração de neutrófilos e da expressão do RNAm para KC no pulmão de camundongos. No mesmo estudo, os pesquisadores

observaram a diminuição da migração de neutrófilos para os pulmões dos camundongos sensibilizados com *Legionella pneumophila* quando administrado anticorpo anti-KC, via intraperitoneal.

Johnston et al., (2005) demonstraram que camundongos BALB/cJ com deficiência de receptor CXCR2 apresentavam diminuição da infiltração de neutrófilos no lavado broncoalveolar, após inalação de ozônio (O₃). Tanimoto et al., (2007) observaram que a administração de anticorpo anti-KC, via intraperitoneal, diminuiu a infiltração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c sensibilizados com células leucêmicas P388.

Em nossos experimentos, observamos que o tacrolimus inibiu de forma significativa os níveis TNF- α , IL-1 β e KC no exsudato de animais tratados com carragenina. A redução dos níveis destas citocinas no local da inflamação foi relacionada à inibição na infiltração de leucócitos na cavidade da bolsa de ar, durante a resposta inflamatória. Nossos resultados estão de acordo com aqueles relatados por Cetinkale et al., (1999), que observaram que o tacrolimus, administrado por via intramuscular, inibiu a infiltração de neutrófilos no pulmão, fígado e rins, no modelo experimental de lesão da pele induzida por queimadura, em ratos. Além disso, Rau et al., (2006) observaram que o tacrolimus também inibiu a infiltração de neutrófilos e reduziu a expressão do RNAm para TNF- α , IL-1 β e IL-2, no modelo experimental de pancreatite aguda induzida por taurocolato, em ratos.

Em nossos experimentos, observamos que o tacrolimus também reduziu os níveis de NO^x. Os efeitos do NO na resposta inflamatória são complexos e envolvem a quimiotaxia de leucócitos e o aumento da permeabilidade vascular. Franco-Penteado et al., (2001) demonstraram que a administração endovenosa de nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), inibiu a formação de edema e a infiltração de neutrófilos, no modelo de edema de pata induzido pela injeção subplantar de enterotoxina estafilocócica, em ratos.

Além disso, Sakaguchi et al., (2006) demonstraram que a administração intraperitoneal de L-NAME inibiu a formação de edema, no modelo experimental de edema de pata induzido pela carragenina, em ratos. Em outros experimentos, Sakaguchi et al., (2006) observaram que a administração intraperitoneal de L-NAME reduziu a formação de exsudato e os níveis de albumina, na pleurisia induzida pela carragenina, em ratos. Farsky et al., (2004) observaram que o tratamento via oral

com L-NAME inibiu o influxo de leucócitos na cavidade da bolsa de ar, em camundongos inflamados com veneno de *Bothrops jararaca*.

Outros estudos obtiveram resultados semelhantes ao obtido em nossa pesquisa, como o desenvolvido por Kato et al., (2007) que demonstraram que o tacrolimus inibiu a expressão do RNAm para enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), no modelo experimental de úlcera induzida por indometacina, em ratos. Além disso, estudos *in vitro* realizados por Tuñón et al., (2003) demonstraram que o tacrolimus inibiu a expressão de RNAm para NOSi em hepatócitos de ratos, incubados com lipopolissacarídeo (LPS). Em estudos anteriores desenvolvidos por Pereira et al., (2006) também demonstraram que o tacrolimus, quando administrado por via intraperitoneal, diminuiu de forma significativa os níveis de NO^x na cavidade pleural de camundongos tratados com carragenina.

A infiltração de leucócitos no tecido é regulada não só pela concentração de mediadores pró-inflamatórios, mas também pela expressão coordenada de moléculas de adesão. Este processo envolve a expressão de selectinas, integrinas e superfamília de moléculas de adesão (RIDGER; HELLEWELL; NORMAN, 2005; KINASHI, 2007). Uma vez ativado este sistema, ocorre o rolamento, a adesão e a transmigração dos leucócitos do meio intravascular para o local da inflamação (RIDGER; HELLEWELL; NORMAN, 2005; KINASHI, 2007).

Em nossos experimentos, o tacrolimus inibiu significativamente o influxo de leucócitos às custas da inibição da migração de neutrófilos no local da inflamação. Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com indometacina ou dexametasona. Noto et al., (2007) demonstraram que a administração endovenosa de tacrolimus em ratos inibiu a infiltração de granulócitos no cérebro e a expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-1, P-selectina e E-selectina por células endoteliais, no modelo experimental de isquemia cerebral induzida por obstrução da artéria cerebral média.

Estudos *in vitro* desenvolvidos por Sasakawa et al., (2005) demonstraram que o tacrolimus foi efetivo em inibir a expressão de moléculas de adesão do tipo E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais humanas. Neste contexto, a hipótese de que o tacrolimus inibe a expressão de moléculas de adesão, no modelo em estudo, não pode ser descartada.

Outro importante resultado obtido neste trabalho foi que o tacrolimus inibiu a atividade da mieloperoxidase e da adenosine-deaminase, ambas enzimas

intimamente envolvidas na infiltração de leucócitos ativados no local da inflamação (FRÖDE; MEDEIROS, 2001). Semelhantes resultados foram obtidos com os animais tratados previamente com os fármacos de referência.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, cuja função é promover a formação de espécies reativas de oxigênio auxiliando na destruição de agentes patogênicos. Por ser um produto dos grânulos dos neutrófilos, a atividade de mieloperoxidase é considerada um marcador de infiltração destas células no local da inflamação (ARNHOLD, 2004).

Vários trabalhos demonstraram a participação da MPO na resposta inflamatória. Dentre eles cita-se o trabalho realizado por Ng et al., (2007) pelo qual se observou aumento da atividade da mieloperoxidase no pulmão, fígado e rins de camundongos, no modelo de sepse induzida por injeção intraperitoneal de LPS. Em outros estudos, Hedge et al., (2007) observaram ainda aumento na atividade da mieloperoxidase no pulmão de camundongos, no modelo de sepse induzida por extravasamento fecal. Bezerra et al., (2007) demonstraram aumento da atividade da mieloperoxidase no exsudato sinovial de ratos, no modelo de artrite induzida por injeção intra-articular de zimosan. Nosál'ová et al., (2007) demonstraram também aumento na atividade da mieloperoxidase no colón de ratos, no modelo de colite induzida por ácido acético.

A adenosina-deaminase é uma enzima liberada principalmente por monócitos e macrófagos durante o processo inflamatório e, dependendo o receptor ativado, apresenta efeito pró ou antiinflamatório (PACHECO et al., 2005). Law et al., (2003) demonstraram que a administração intraperitoneal ou endovenosa de pentostatina, um inibidor de adenosina-deaminase, inibiu a ativação de leucócitos bem como aumentou a sobrevivência de ratos, no modelo de sepse induzida por extravasamento fecal. Antonioli et al., (2007) observaram que ao administrar via intraperitoneal o 4-amino-2-(2-hidroxi-1-decil)pirazole[3,4-d]pirimidina (APP), um inibidor de adenosina-deaminase, em ratos, ocorreu redução da lesão tecidual e redução dos níveis de MPO, TNF- α e IL-6 no colón, no modelo de colite induzida por ácido 2,4-dinitrobenzenossulfônico administrado via intra-retal.

Odashima et al., (2006) demonstraram que a administração intraperitoneal de agonista seletivo para receptores A_{2A}, ATL-146e, em camundongos, reduziu os níveis de alanina aminotransferase (ALT), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α),

interleucina-6 (IL-6) e interferon- γ (IFN- γ), no modelo de lesão hepática induzida pela administração endovenosa de concanavalina A. Estudos *in vitro* desenvolvidos por Hamano et al., (2007) demonstraram que a ativação de receptores A_{2A} inibiu a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e a liberação de TNF- α , por células mononucleares do sangue periférico humano, estimuladas com LPS.

Outros estudos têm destacado a participação do receptor A_3 no processo inflamatório. Este receptor parece ter uma participação controversa na inflamação, podendo apresentar efeitos pró ou antiinflamatórios quando ativado. Ochaion et al., (2006) demonstraram que o tratamento com metotrexato não só aumenta a concentração de adenosina, mas também aumenta a expressão de receptores adenosina A_3 na pata e em células mononucleares do sangue periférico de ratos, no modelo de artrite induzida por *Mycobacterium tuberculosis*. Este mesmo estudo observou que o tratamento combinado de metotrexato e CF-101, um potente agonista de receptor A_3 , apresentou efeito antiinflamatório, reduzindo significativamente a infiltração de células e a destruição da cartilagem e do osso na articulação de ratos, no modelo de artrite induzida por *Mycobacterium tuberculosis*.

Em modelo experimental de peritonite séptica induzida por extravasamento fecal, Lee et al., (2006) observaram aumento da mortalidade e da disfunção renal e hepática em camundongos deficientes de receptores adenosina A_3 .

Pereira et al., (2006) também observaram que o tacrolimus inibiu a atividade das enzimas MPO e ADA na inflamação induzida pela carragenina em camundongos, no modelo da pleurisia.

Desta forma, foi possível observar estudos que a eficácia do tacrolimus como fármaco antiinflamatório não se restringe somente à diminuição dos níveis de mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , KC e óxido nítrico e da atividade das enzimas MPO e ADA, mas também inclui a inibição da infiltração de leucócitos ao sítio de inflamação, na resposta induzida pela carragenina. Os resultados obtidos com o tacrolimus foram também muito semelhantes aos observados em animais tratados com indometacina ou dexametasona, sugerindo que este fármaco tenha um efeito antiinflamatório semelhante ao dos fármacos de referência.

5 CONCLUSÕES

1. A atividade antiinflamatória do tacrolimus parece estar relacionada à inibição de enzimas (mieloperoxidase e adenosina-deaminase), citocinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e KC), bem como de mediadores pró-inflamatórios (óxido nítrico).
2. O efeito antiinflamatório do tacrolimus exibiu um perfil antiinflamatório semelhante ao da indometacina e da dexametasona.

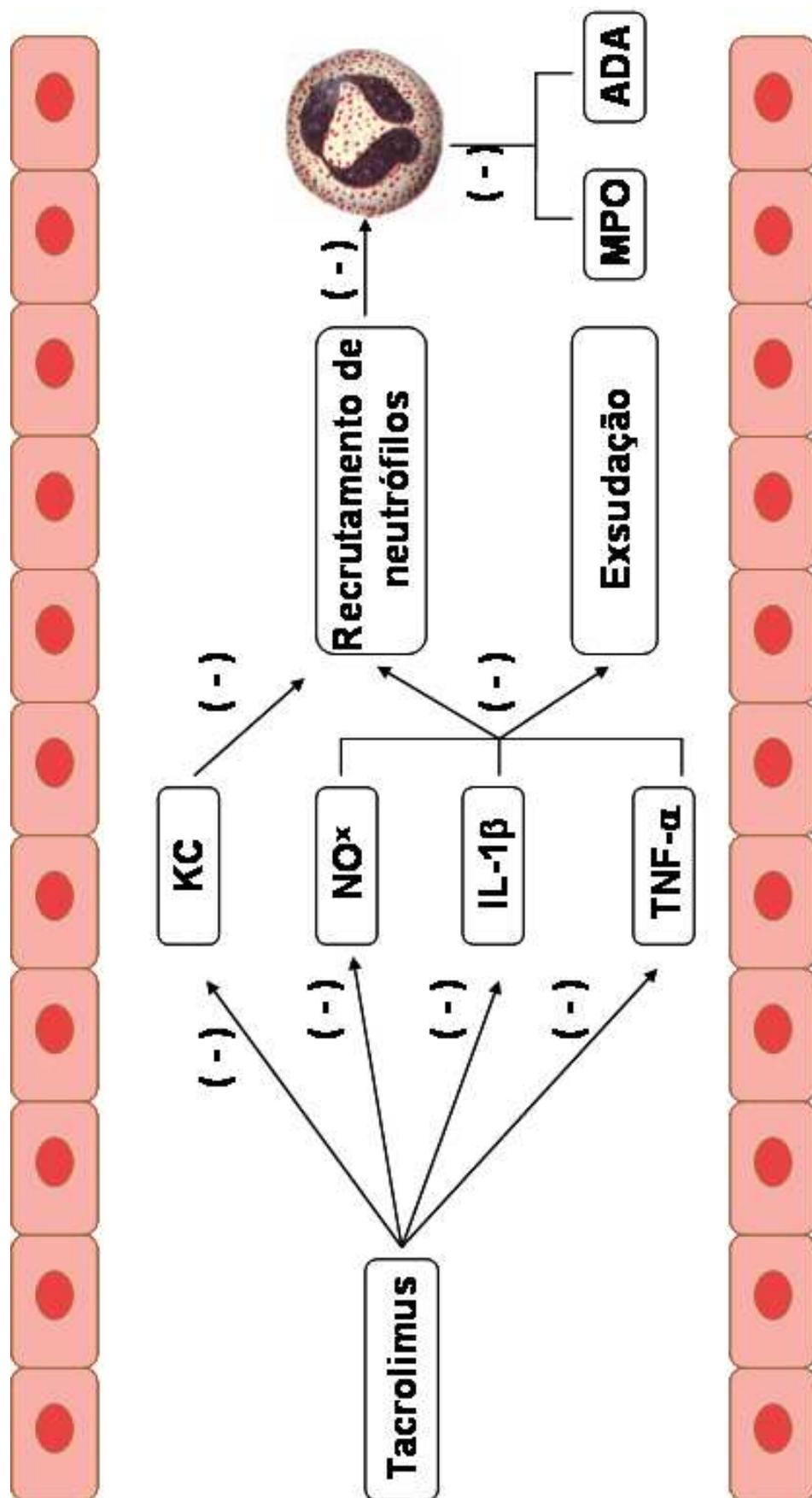


Figura 1: Atividade antiinflamatória proposta para o tacrolimus. KC = quimocina para neutrófilos; NO_x = óxido nítrico; IL-1β = Interleucina-1 beta; TNF-α = fator de necrose tumoral alfa; MPO = Mieloperoxidase; ADA = Adenosina-deaminase; (-) = ação inibitória do tacrolimus.

6 PERSPECTIVAS

1. Avaliar o efeito do tacrolimus sobre a expressão de RNAm para mediadores e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e KC).
2. Avaliar o efeito antiinflamatório do tacrolimus em outros modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, A.C.. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*. v. 47, p. 63–83, 2000.
- AIKO, S.; CONNER, E.M.; FUSELER, J.A.; GRISHAM, M.B.. Effects of cyclosporine or FK506 in chronic colitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. v. 280, n. 2, p. 1075-1084, 1997.
- ANTONIOLI, L.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; GHISU, N.; DA SETTIMO, F.; NATALE, G.; KASTSIUCHENKA, O.; DURANTI, E.; VIRDIS, A.; VASSALLE, C.; LA MOTTA, C.; MUGNAINI, L.; BRESCHI, M.C.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M.. Inhibition of Adenosine Deaminase Attenuates Inflammation in Experimental Colitis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 322, n. 2, p. 435- 442, 2007.
- ARATANI, Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; SUZUKI, K.; DINAUER, M.C.; MAEDA, N.; KOYAMA, H.. In Vivo Role of Myeloperoxidase for the Host Defense. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. v. 57, n. 5, p. S15, 2004.
- ARNHOLD, J.. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry*. v. 69, n. 1, p. 4-9, 2004.
- BARKSBY, H.E.; LEA, S.R.; PRESHAW, P.M.; TAYLOR, J.J.. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology*. v. 149, n. 2, p. 217-225, 2007.
- BARSANTE, M.M.; CUNHA, T.M.; ALLEGRETTI, M.; CATTANI, F.; POLICANI, F.; BIZZARRI, C.; TAFURI, W.L.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, M.M.. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *British Journal of Pharmacology*. Doi: 10.1038/sj.bjp.0707462. 2007.
- BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. Anti-inflammatory effects of the *Passiflora edulis*: forma *flavicarpa* Degener inhibition of leukocytes, enzymes and pro-inflammatory cytokine levels in the air pouch model, in mice. *Food Chemistry*. v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.
- BEZERRA, M.M.; BRAIN, S.D.; GIRÃO, V.C.; GREENACRE, S.; KEEBLE, J.; ROCHA, F.A.. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. v. 374, n. 4, p. 265-273, 2007.
- BLOEMEN, K.; VERSTRAELEN, S.; VAN DEN HEUVEL, R.; WITTERS, H.; NELISSEN, I.; SCHOETERS, G.. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*. Doi:10.1016 /j.imlet.2007.07.010. 2007.
- BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O.E.; THEILGAARD-MÖNCH, K.. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*. v. 28, n. 8, p. 340-345, 2007.

- BOZZA, F.A.; SALLUH, J.I.; JAPIASSU, A.M.; SOARES, M.; ASSIS, E.F.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T.. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Critical Care*. v. 11, n. 2, p. R49, 2007.
- BRESSAN, E.; CUNHA, F.Q.; TONUSSI, C.R.. Contribution of TNFalpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. *Cytokine*. v. 36, n. 1-2, p. 83-89, 2006.
- BUSH, E.L.; LIN, S.S.. Lung transplantation: advances in immunosuppression. *Thoracic Surgery Clinics*. v. 16, n. 4, p. 421-433, 2006.
- CARUSO, M.; HOLGATE, S.T.; POLOSA, R.. Adenosine signalling in airways. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 6, p. 251-256, 2006.
- CETINKALE, O.; KONUKOĞIU, D.; SENEL, O.; KEMERLI, G.D.; YAZAR, S.. Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns*. v. 25, n. 2, p. 105-112, 1999.
- CHO, J.W.; LEE, K.S.; KIM, C.W.. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *International Journal of Molecular Medicine*. v. 19, n. 3, p. 469-474, 2007.
- CHUNG, K.F.. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*. v. 4, n. 6, p. 619-625, 2005.
- CONLON, B.A.; LAW, W.R.. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clinical and Experimental Immunology*. v. 138, p. 14-20, 2004.
- CORRAL, I.; QUEREDA, C.; NAVAS, E.; MARTÍN-DÁVILA, P.; PÉREZ-ELÍAS, M.J.; CASADO, J.L.; PINTADO, V.; COBO, J.; PALLARÉS, E.; RUBÍ, J.; MORENO, S.. Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of HIV-infected patients: limited value for diagnosis of tuberculous meningitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. v. 23, n. 6, p. 471-476, 2004.
- DESMETZ, C.; LIN, Y.L.; METTLING, C.; PORTALÈS, P.; NOËL, D.; CLOT, J.; JORGENSEN, C.; CORBEAU, P.. Cell surface CCR5 density determines the intensity of T cell migration towards rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clinical Immunology*. v.123, n. 2, p. 148-154, 2007.
- DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- EZQUERRA, G.M.; REGANA, M.S.; ACOSTA, E.H.; MILLET, P.U.. Topical tacrolimus for the treatment of psoriasis on the face, genitalia, intertriginous areas and corporal plaques. *Journal of Drugs in Dermatology*. v. 5, n. 4, p. 334-336, 2006.

- EKMEKCI, O.B.; DONMA, O.; SARDOĞAN, E.; YILDIRIM, N.; UYSAL, O.; DEMIREL, H.; DEMIR, T.. Iron, nitric oxide, and myeloperoxidase in asthmatic patients. *Biochemistry*. v.69, n. 4, p. 462-467, 2004.
- FARSKY, S.H.P.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; PROTO, S.Z.; FERREIRA, J.M. JR.; MELLO, S.B.V.. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflammation Research*. v. 53, n. 9, p. 442-452, 2004.
- FERRANDI, C.; ARDISSONE, V.; FERRO, P.; RÜCKLE, T.; ZARATIN, P.; AMMANNATI, E.; HAUBEN, E.; ROMMEL, C.; CIRILLO, R.. Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 322, n. 3, p. 923-930, 2007.
- FRANCO-PENTEADO, C.F.; DESOUZA, I.; TEIXEIRA, S.A.; RIBEIRO-DASILVA, G.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. *Biochemical Pharmacology*. v. 61, n. 10, p. 1305-1311, 2001.
- FRANK, J.A.; PITTET, J.F.; WRAY, C.; MATTHAY, M.A.. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax*. Doi:10.1136/thx.2007.079608. 2007.
- FRÖDE, 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 of Inflammation*. v. 10, n. 4, p. 223-227, 2001.
- GIUSTI, G.; GALANTI, B.. Adenosine deaminase: colourimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (ed) *Methods of enzymatic analyses*, 3th ed. Verlag Chemie, Weinheim: Germany, pp 315-323, 1984.
- GONZALEZ-LAMA, Y.; GISBERT, J.P.; MATE, J.. The role of tacrolimus in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Digestive Diseases and Sciences*. v. 51, n. 10, p. 1833-1840, 2006.
- 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. *Analytical Biochemistry*. v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GUO, R.F.; RIEDEMANN, N.C.; SUN, L.; GAO, H.; SHI, K.X.; REUBEN, J.S.; SARMA, V.J.; ZETOUNE, F.S.; WARD, P.A.. Divergent signaling pathways in phagocytic cells during sepsis. *Journal of Immunology*. v.177, n. 2, p. 1306-1313, 2006.
- HADDAD, E.M.; MCALISTER, V.C.; RENOUF, E.; MALTHANER, R.; KJAER, M.S.; GLUUD, L.L.. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. v. 18, n. 4, p. 5161, 2006.

HAMANO, R.; TAKAHASHI, H.K.; IWAGAKI, H.; KANKE, T.; LIU, K.; YOSHINO, T.; SENDO, T.; NISHIBORI, M.; TANAKA, N.. Stimulation of Adenosine A2A Receptor Inhibits LPS-Induced Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 and Production of TNF-alpha in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Shock*. Doi: 10.1097/shk. 0b013 e31812385da. 2007.

HEGDE, A.; ZHANG, H.; MOOCHHALA, S.M.; BHATIA, M.. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 82, n. 3, p. 678-685, 2007.

HEIDLAND, A.; KLASSEN, A.; RUTKOWSKI, P.; BAHNER, U.. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? *Journal of Nephrology*. v. 19, n. 10, p. S102-109, 2006.

JACQUES, C.; GOSSET, M.; BERENBAUM, F.; GABAY, C.. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitamins and Hormones*. v. 74, p. 371-403, 2006.

JEAN-BAPTISTE, E.. Cellular mechanisms in sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*. v. 22, n. 2, p. 63-72, 2007.

JOHNSTON, R.A.; MIZGERD, J.P.; SHORE, S.A.. CXCR2 is essential for maximal neutrophil recruitment and methacholine responsiveness after ozone exposure. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. v. 288, n. 1, p. 61-67, 2005.

KAI, Y.; YONEYAMA, H.; KOYAMA, J.; HAMADA, K.; KIMURA, H.; MATSUSHIMA, K.. Treatment with chondroitinase ABC alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Medical Molecular Morphology*. v. 40, n. 3, p. 128-140, 2007.

KAPUR, N.; CHANG, A.B.. Oral non steroid anti-inflammatories for children and adults with bronchiectasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. v. 17, n. 4, CD006427. 2007.

KATO, S.; NISHIO, H.; OGURA, M.; TAKEUCHI, K.. Tacrolimus (FK506), an Immunosuppressive Agent, Prevents Indomethacin-Induced Small Intestinal Ulceration in the Rat: Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *Journal of Pharmacological Sciences*. v. 103, p. 40-47, 2007.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P.. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KINASHI, T.. Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Advances in Immunology*. v. 93, p. 185-227, 2007.

KINO, T.; HATANAKA, H.; HASHIMOTO, M.; NISHIYAMA, M.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H.. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics*. v. 40, n. 9, p. 1249-1255, 1987.

- KITAHARA, K.; KAWAI, S.. Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. v. 19, n. 3, p. 238-245, 2007.
- KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S.G.. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*. v. 113, p. 427-437, 2004.
- KUMAR, S.; SINGHAL, V.; ROSHAN, R.; SHARMA, A.; REMBHOTKAR, G.W.; GHOSH, B.. Piperine inhibits TNF-alpha induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF-kappaB and IkappaB kinase activation. *European Journal of Pharmacology*. Doi:10.1016/j.ejphar. 2007. 07.056. 2007.
- LAMSAL, M.; GAUTAM, N.; BHATTA, N.; MAJHI, S.; BARAL, N.; BHATTACHARYA, S.K.. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. v. 38, n. 2, p. 363-369, 2007.
- LAN, C.C.; YU, H.S.; WU, C.S.; KUO, H.Y.; CHAI, C.Y.; CHEN, G.S.. FK506 inhibits tumour necrosis factor-alpha secretion in human keratinocytes via regulation of nuclear factor-kappaB. *The British Journal of Dermatology*. v. 153, n. 4, p. 725-732, 2005.
- LAPA e SILVA, J.R.; RUFFIÉ, C.; LEFORT, J.; NAHORI, M.A.; VARGAFTIG, B.B.; PRETOLANI, M.. Prevention of antigen-induced bronchial hyperreactivity and airway inflammation in sensitized guinea-pigs by tacrolimus. *Mediators of Inflammation*. v. 8, n. 1, p. 17-23, 1999.
- LAW, W.R.; VALLI, V.E.; CONLON, B.A.. Therapeutic potential for transient inhibition of adenosine deaminase in systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine*. v. 31, n. 5, p. 1475-1481, 2003.
- LEE, H.T.; KIM, M.; JOO, J.D.; GALLOS, G.; CHEN, J.F.; EMALA, C.W.. A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v. 291, n. 4, p. 959-969, 2006.
- LIN, H.L.; XU, X.S.; LU, H.X.; ZHANG, L.; LI, C.J.; TANG, M.X.; SUN, H.W.; LIU, Y.; ZHANG, Y.. Pathological mechanisms and dose dependency of erythrocyte-induced vulnerability of atherosclerotic plaques. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v.43, n. 3, p. 272-280, 2007.
- MAGARI, K.; MIYATA, S.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.; GOTO, T.. Calcineurin inhibitors exert rapid reduction of inflammatory pain in rat adjuvant-induced arthritis. *British Journal of Pharmacology*. v. 139, n. 5, p. 927-934, 2003.
- MAGARI, K.; MIYATA, S.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.. Inflammatory cytokine levels in paw tissues during development of rat collagen-induced arthritis: effect of FK506, an inhibitor of T cell activation. *Inflammation Research*. v. 53, n. 9, p. 469-474, 2004.

MCCOLL, B.W.; ROTHWELL, N.J.; ALLAN, S.M.. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *The Journal of Neuroscience*. v. 27, n. 16, p. 4403-4412, 2007.

MCCORMACK, P.L.; KEATING, G.M.. Tacrolimus: in heart transplant recipients. *Drugs*. v. 66, n. 17, p. 2269-2279, 2006.

MIYATA, S.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflammation Research*. v. 54, n. 1, p. 1-9, 2005.

MOK, M.Y.; FUNG, P.C.; OOI, C.; TSE, H.F.; WONG, Y.; LAM, Y.M.; WONG, W.S.; LAU, C.S.. Serum nitric oxide metabolites and disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*. Doi 10.1007/s10067-007-0708-9. 2007.

MORISHITA, Y.; HIRAYAMA, Y.; MIYAYASU, K.; TABATA, K.; KAWAMURA, A.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.. FK506 aerosol locally inhibits antigen-induced airway inflammation in Guinea pigs. *International Archives of Allergy and Immunology*. v. 136, n. 4, p. 372-378, 2005.

NAKAE, S.; LUNDERIUS, C.; HO, L.H.; SCHÄFER, B.; TSAI, M.; GALLI, S.J.. TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 119, n. 3, p. 680-686, 2007.

NAKAGAWA, H.. Comparison of the efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment with topical corticosteroids in adult patients with atopic dermatitis: review of randomised, double-blind clinical studies conducted in Japan. *Clinical Drug Investigation*. v. 26, n. 5, p. 235-246, 2006.

NG, S.W.; ZHANG, H.; HEGDE, A.; BHATIA, M.. Role of preprotachykinin-A gene products on multiple organ injury in LPS-induced endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*. DOI:10.1189/jlb.0807575. 2007.

NOSÁL'OVÁ, V.; ZEMAN, M.; CERNÁ, S.; NAVAROVÁ, J.; ZAKÁLOVÁ, M.. Protective effect of melatonin in acetic acid induced colitis in rats. *Journal of Pineal Research*. v. 42, n. 4, p. 364-370, 2007.

NOTO, T.; FURUICHI, Y.; ISHIYE, M.; MATSUOKA, N.; ARAMORI, I.; MUTOH, S.; YANAGIHARA, T.. Tacrolimus (FK506) limits accumulation of granulocytes and platelets and protects against brain damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v. 30, n. 2, p. 313-317, 2007.

ODASHIMA, M.; OTAKA, M.; JIN, M.; HORIKAWA, Y.; MATSUHASHI, T.; OHBA, R.; LINDEN, J.; WATANABE, S.. A selective adenosine A2A receptor agonist, ATL-146e, prevents concanavalin A-induced acute liver injury in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 347, n. 4, p. 949-954, 2006.

OCHAION, A.; BAR-YEHUDA, S.; COHN, S.; DEL VALLE, L.; PEREZ-LIZ, G.; MADI, L.; BARER, F.; FARBSTEIN, M.; FISHMAN-FURMAN, S.; REITBLAT, T.; REITBLAT, A.; AMITAL, H.; LEVI, Y.; MOLAD, Y.; MADER, R.; TISHLER, M.; LANGEVITZ, P.; ZABUTTI, A.; FISHMAN, P.. Methotrexate enhances the anti-inflammatory effect of CF101 via up-regulation of the A3 adenosine receptor expression. *Arthritis Research & Therapy*. v. 8, n. 6, p. R169, 2006.

OLSEN, T.; GOLL, R.; CUI, G.; HUSEBEKK, A.; VONEN, B.; BIRKETVEDT, G.S.; FLORHOLMEN, J.. Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. p.1-9, 2007.

PACHECO, R.; MARTINEZ-NAVIO, J.M.; LEJEUNE, M.; CLIMENT, N.; OLIVA, H.; GATELL, J.M.; GALLART, T.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R.. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.102, n. 27, p. 9583–9588, 2005.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRÖDE, T.S.. Antiinflammatory effects Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. *Transplant Immunology*. v. 16, n. 2, p. 105-111, 2006.

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*. v. 17, n. 6, p. 723-741, 1993.

RAO, R.M.; YANG, L.; GARCIA-CARDENA, G.; LUSCINSKAS, F.W.. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation Research*. v. 101, n. 3, p. 234-247, 2007.

RAU, B.M.; KRÜGER, C.M.; HASEL, C.; OLIVEIRA, V.; RUBIE, C.; BEGER, H.G.; SCHILLING, M.K.. Effects of immunosuppressive and immunostimulative treatment on pancreatic injury and mortality in severe acute experimental pancreatitis. *Pancreas*. v. 33, n. 2, p. 174-183, 2006.

RIDGER, V.C.; HELLEWELL, P.G.; NORMAN, K.E.. L- and P-Selectins Collaborate to Support Leukocyte Rolling *in vivo* When High-Affinity P-Selectin-PSelectin Glycoprotein Ligand-1 Interaction Is Inhibited. *The American Journal of Pathology*. v. 166, n. 3, p. 945-952, 2005.

ROEHRL, M.H.; KANG, S.; ARAMBURU, J.; WAGNER, G.; RAO, A.; HOGAN, P.. Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein–protein interaction with small organic molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 101, n. 20, p. 7554–7559, 2004.

ROLLA, G.; FERRERO, N.; BERGIA, R.; GUIDA, G.. Perspectives in clinical immunology. *Recenti progressi in medicina*. v. 97, n. 12, p. 787-797, 2006.

ROSTÈNE, W.; KITABGI, P.; Parsadaniantz, S.M.. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews. Neuroscience*. v. 8, n. 11, p. 895-903, 2007.

RUBIE, C.; FRICK, V.O.; PFEIL, S.; WAGNER, M.; KOLLMAR, O.; KOPP, B.; GRABER, S.; RAU, B.M.; SCHILLING, M.K.. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. v. 13, n. 37, p. 4996-5002, 2007.

SAKAGUCHI, Y.; SHIRAHASE, H.; KUNISHIRO, K.; ICHIKAWA, A.; KANDA, M.; UEHARA, Y.. Synergistic effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced paw edema in rats. *Arzneimittel-Forschung*. v. 56, n. 10, p. 695-699, 2006.

SAKAGUCHI, Y.; SHIRAHASE, H.; KUNISHIRO, K.; ICHIKAWA, A.; KANDA, M.; UEHARA, Y.. Effect of combination of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Life Sciences*. v. 79, n. 5, p. 442-447, 2006.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*. v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SASAKAWA, T.; SASAKAWA, Y.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.. FK506 inhibits prostaglandin E2 production from synovial cells by suppressing peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*. v. 5, n. 7-8, p. 1291-1297, 2005.

SASAKAWA, T.; SASAKAWA, Y.; MASUNAGA, T.; FUJITSU, T.; HIRAYAMA, Y.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S.. FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor a secretion from peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. v. 29, n. 2, p. 67-71, 2005.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W.. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*. v. 8, p. 93 – 151, 2006.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P.. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions*. v. 18, n. 3-4, p. 439-446, 1986.

SEELY, A.J.E.; PASCUAL, J.L.; CHRISTOU, N.V.. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care*. v. 7, p. 291-307, 2003.

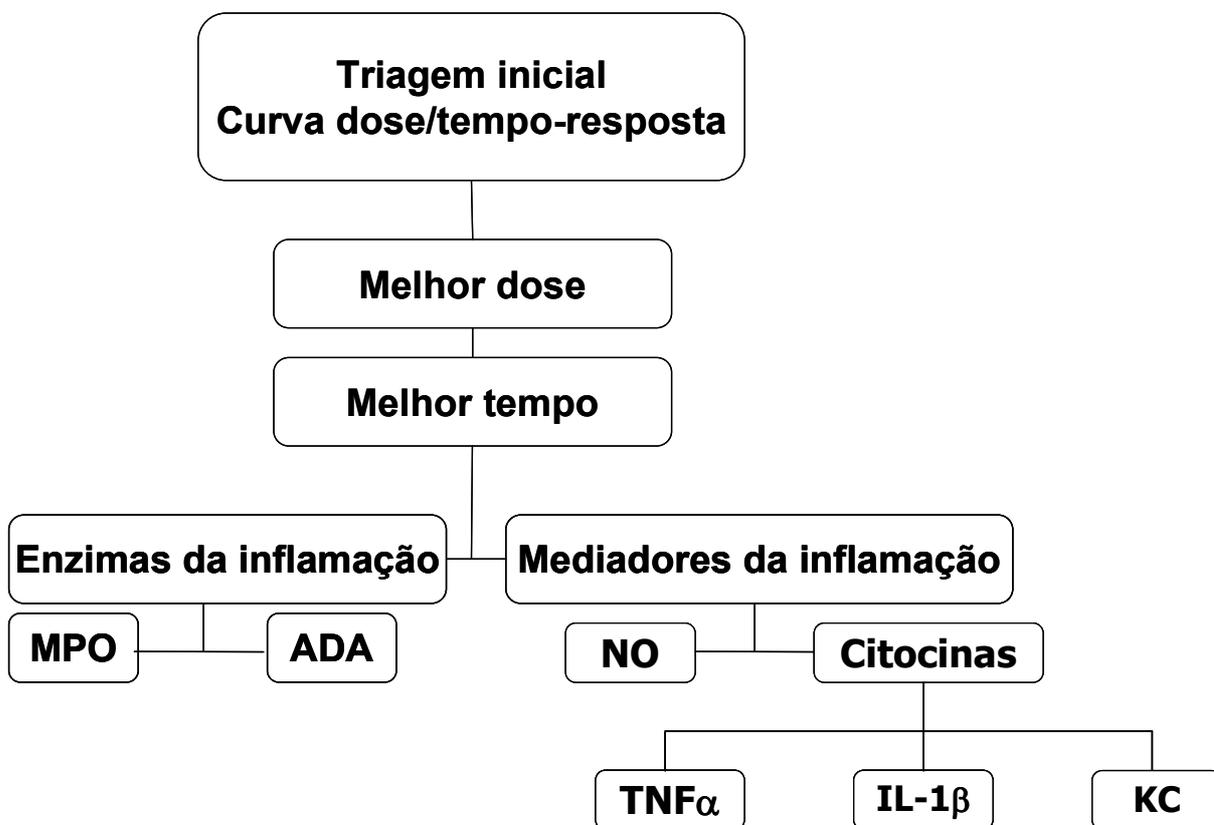
SEGERER, S.; SCHLÖNDORFF, D.. Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney. *Seminars in Nephrology*. v. 27, v. 3, p. 260-274, 2007.

SETA, N.; KUWANA, M.. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *The Keio Journal of Medicine*. v. 56, n. 2, p. 41-47, 2007.

- SHEU, J.N.; CHEN, M.C.; CHENG, S.L.; LEE, I.C.; CHEN, S.M.; TSAY, G.J.. Urine interleukin-1beta in children with acute pyelonephritis and renal scarring. *Nephrology (Carlton, Vic.)*. v.12, n. 5, p. 487-493, 2007.
- SPICUZZA, L.; DI MARIA, G.; POLOSA, R.. Adenosine in the airways: Implications and applications. *European Journal of Pharmacology*. v. 533, p. 77-88, 2006.
- STRESTIKOVA, P.; OTOVA, B.; FILIPEC, M.; MASEK, K.; FARGHALI, H.. Different mechanisms in inhibition of rat macrophage nitric oxide synthase expression by FK 506 and cyclosporin A. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. v. 23, n. 1, p. 67-74, 2001.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J.. Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 35, n. 6, p. 881-900, 2003.
- TAMAOKI, J.; ISONO, K.; TAIRA, M.; TAGAYA, E.; NAKATA, J.; KAWATANI, K.; NAGAI, A.. Role of regular treatment with inhaled corticosteroid or leukotriene receptor antagonist in mild intermittent asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*. v. 29, n. 2, p. 189-196. 2008.
- TANIMOTO, N.; TERASAWA, M.; NAKAMURA, M.; KEGAI, D.; AOSHIMA, N.; KOBAYASHI, Y.; NAGATA, K.. Involvement of KC, MIP-2, and MCP-1 in leukocyte infiltration following injection of necrotic cells into the peritoneal cavity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 361, n. 2, p. 533-536, 2007.
- TATEDA, K.; MOORE, T.A.; NEWSTEAD, M.W.; TSAI, W.C.; ZENG, X.; DENG, J.C.; CHEN, G.; REDDY, R.; YAMAGUCHI, K.; STANDIFORD, T.J.. Chemokine-Dependent Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Legionella Pneumonia: Potential Role of Neutrophils as Immunoregulatory Cells. *Infection and Immunity*. v. 69, n. 4, p. 2017-2024, 2001.
- TILG, H.; MOSCHEN, A.; KASER, A.. Mode of function of biological anti-TNF agents in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*. v. 7, n. 7, p. 1051-1059, 2007.
- TSIMIKAS, S.. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. v. 98, n. 11A, p. 9-17, 2006.
- TUÑÓN, M.J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GUTIÉRREZ, B.; CULEBRAS, J.M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. v. 66, n. 3, p. 439-445, 2003.
- VENKATESH, N.; FENG, Y.; DEDECKER, B.; YACONO, P.; GOLAN, D.; MITCHISON, T.; MCKEON, F.. Chemical genetics to identify NFAT inhibitors: Potential of targeting calcium mobilization in immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*. v. 101, n. 24, p. 8969-8974, 2004.

- VUOLTEENAHO, K.; MOILANEN, T.; KNOWLES, R.G.; MOILANEN, E.. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. p. 247-258, 2007.
- WARK, P.A.; BUCCHIERI, F.; JOHNSTON, S.L.; GIBSON, P.G.; HAMILTON, L.; MIMICA, J.; ZUMMO, G.; HOLGATE, S.T.; ATTIA, J.; THAKKINSTIAN, A.; DAVIES, D.E.. IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 120, n. 3, p. 586-593, 2007.
- WENTE, M.N.; SAUER, P.; MEHRABI, A.; WEITZ, J.; BUCHLER, M.W.; SCHMIDT, J.; SCHEMMER, P.. Review of the clinical experience with a modified release form of tacrolimus [FK506E (MR4)] in transplantation. *Clinical Transplantation*. v. 20, n. 17, p. 80-84, 2006.
- WILLIAMS, R.O.. Pathogenesis and therapy of rheumatoid arthritis. *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*. v.1, p. 107-130, 2006.
- WOOLLEY, S.M.; FARIVAR, A.S.; NAIDU, B.V.; ROSENGART, M.; THOMAS, R.; FRAGA, C.; MULLIGAN, M.S.. Endotracheal calcineurin inhibition ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. v. 127, n. 2, p. 376-384, 2004.
- WONG, M.M.; FISH, E.M.. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology*. v. 15, p. 5-14, 2003.
- YAMAMOTO, S.; SUGAHARA, S.; IKEDA, K.; SHIMIZU, Y.. Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by a novel phosphodiesterase 7 and 4 dual inhibitor, YM-393059. *European Journal of Pharmacology*. v. 559, n. 2-3, p. 219-226, 2007.
- YOCUM, D.E.; FURST, D.E.; KAINE, J.L.; BALDASSARE, A.R.; STEVENSON, J.T.; BORTON, M.A.; MENGLE-GAW, L.J.; SCHWARTZ, B.D.; WISEMANDLE, W.; MEKKI, Q.A.. Efficacy and safety of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind trial. *Arthritis and Rheumatism*. v. 48, n. 12, p. 3328-3337, 2003.
- ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L.M.; TALAL, A.H.. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*. v 14, p. 675-687, 2007.
- ZIMMERMANN, M.. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.
- ZWERINA, J.; REDLICH, K.; POLZER, K.; JOOSTEN, L.; KRÖNKE, G.; DISTLER, J.; HESS, A.; PUNDT, N.; PAP, T.; HOFFMANN, O.; GASSER, J.; SCHEINECKER, C.; SMOLEN, J.S.; VAN DEN BERG, W.; SCHETT, G.. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 104, n. 28, p. 11742-11747, 2007.

APÊNDICE A - Protocolo do estudo da atividade antiinflamatória do tacrolimus



Apêndice 1 - Protocolo do estudo da atividade antiinflamatória do tacrolimus.

ANEXO A - Protocolo e Cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais