



Universidade Federal de Santa Catarina

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

**MARCELO BARRETO SPILLERE DA SILVA**

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DOS LIGANTES DO RECEPTOR  
BENZODIAZEPÍNICO PERIFÉRICO (PK 11195 e Ro5-4864) NO MODELO DE  
PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.**

Florianópolis (SC), Fevereiro de 2004.



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

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DOS LIGANTES DO RECEPTOR  
BENZODIAZEPÍNICO PERIFÉRICO (PK 11195 e Ro5-4864) NO MODELO DE  
PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS.**

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

Aluno: Marcelo Barreto Spillere da  
Silva  
Orientadora: Prof. Dra. Tânia Silvia  
Fröde  
Co-orientadora: Prof. Dra. Roseli  
Coimbra Farges

Florianópolis (SC), Fevereiro de 2004.

Da Silva, Marcelo Barreto Spillere

Efeito Antiinflamatório dos ligantes do Receptor Benzodiazepínico Periférico (PK11195 e Ro5-4864) no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos / Marcelo Barreto Spillere da Silva, Florianópolis, 2004, 134p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

1. PK11195; 2. Ro5-4864; 3. Inflamação; 4. pleurisia; 5. camundongos.

*“Acredite em você  
mesmo e você aprenderá a  
viver.” (Goethe)*

Aos meus Pais, *Márcio e Maria Águeda*,  
minhas avós, Gilita e Maria, que dedicam a  
vida aos filhos e netos, com amor, carinho,  
sabedoria e que sempre apoiaram as  
escolhas que fiz.

A Tatiane, pelo seu companheirismo,  
incentivo, apoio em todas as horas e  
sempre demonstrando o quanto a vida é  
bela.

A Professora *Tânia Silvia Fröde*, pelo apoio, incentivo e segurança dispensados durante o meu mestrado. O seu profissionalismo, dedicação e integridade são exemplos a seguir e suas orientações podem ser consideradas um privilégio.

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup> Roseli Coimbra Farges, por sua co-orientação.

Aos professores do Departamento de Pós-graduação em Farmácia, em especial aos amigos, Celso Spada, Marcos Machado, Marcos Seggatto, Jairo, Mirian Falkenberg.

Aos colegas de laboratório Denise, Eduardo, Álvaro, Silvana, Vanessa e Ana Beatriz, pela amizade compartilhada, pelos grandes momentos de alegria, reflexão e fraternidade.

Aos colegas da turma de Mestrado: Teófilo, Aline, Bia, Cíntia, Danusa, Lorena, Grazi, Giovana, Rodrigo, Alexandre, Ana Paula, Silvânia, Pablo, Joel e Darlene, pelo apoio e claro, pelos inesquecíveis momentos de descontração, Valeu Galera (HÂÂÂÂ, o que ééééé)...

Aos “brothers” de sempre: César, Bela, Charles, Tio Báu, Tio Tono, Raquel, Marcelo, Renata, Leonardo (Léo), Erlon, Fábio, Fernanda, Anderson, Romson e Ubirajara (BIRASAN), pelo apoio, lealdade e amizade sincera.

Aos meus queridos familiares Sr. Conrado, D. Irani, Christine, Fabiano.

Aos funcionários do Hemosc, setor de Hemopatologia, Marilene, Cláudia e Maria aparecida, pela importante colaboração e troca de informação.



<b>SUMÁRIO</b>	<b>PÁG.</b>
Lista de Abreviações.....	i
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1.INFLAMAÇÃO.....	01
1.2.CÉLULAS ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO.....	06
1.2.1.Neutrófilos.....	06
1.2.2.Mononucleares.....	07
1.3.MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	07
1.4.MEDIADORES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO.....	10
1.4.1.Metabólitos do ácido araquidônico.....	10
1.4.2.Citocinas.....	11
1.4.3.Óxido Nítrico.....	12
1.5.Fator de transcrição nuclear.....	13
1.6 Enzimas pró-inflamatórias.....	14
1.6.1. Mieloperoxidase.....	14
1.6.2 Adenosina-deaminase.....	15
1.7. RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO PERIFÉRICO.....	16
1.8. LIGANTES DO RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO PERIFÉRICO.....	21
1.8.2.Ligantes sintéticos (PK11195 e Ro5-4864).....	21
1.9. MODELO EXPERIMENTAL.....	23

1.9.1. Modelo da pleurisia induzida pela carragenina.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. ANIMAIS.....	32
4.2. MODELO DE INFLAMAÇÃO UTILIZADO.....	32
4.2.1. Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	32
4.3. TÉCNICAS UTILIZADAS.....	33
4.3.1. Contagem total e diferencial celular na cavidade pleural e no sangue de camundongos com pleurisia.....	33
. <i>Coloração dos esfregaços celulares utilizando-se o May-Grünwald-Giemsa.</i>	34
4.3.2. Determinação do exsudato na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	34
4.3.3. Determinação da permeabilidade vascular em tecidos de camundongos com pleurisia.....	35
4.3.4. Determinação da mieloperoxidase nas amostras colhidas do lavado pleural de camundongos com pleurisia.....	36
4.3.5. Determinação da adenosina-deaminase nas amostras colhidas do lavado pleural de camundongos com pleurisia.....	36
4.3.6. Análise quantitativa do Nitrito/Nitrato (ON <sup>x</sup> ) nas amostras colhidas do lavado pleural de camundongos com pleurisia.....	37
4.3.7. Análise histológica de amostras de pulmão, baço e fígado de camundongos com pleurisia.....	38

. Coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-Eosina.....	40
4.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	40
4.4.1. Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre os níveis da exsudação e da migração leucocitária no sangue e na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	40
4.4.2.Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos com pleurisia.....	42
4.4.3. Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre os níveis da mieloperoxidase, da adenosina-deaminase e do Nitrito/Nitrato (ON <sup>x</sup> ) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.....	43
4.4.4. Análise histológica de amostras de pulmão, baço e fígado de camundongos com pleurisia tratados com ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864).....	44
4.4.5 Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) em animais com pleurisia tratados com DL-aminoglutatimida.....	45
4.5 REAGENTES.....	46
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Efeito do PK11195 sobre os níveis de leucócitos e exsudato em camundongos com pleurisia .....	48
5.2. Efeito do PK11195 sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia.....	53
5.3. Efeito do PK11195 sobre a permeabilidade vascular em camundongos com pleurisia.....	56

5.4. Efeito do PK11195 sobre as concentrações da mieloperoxidase, da adenosina-deaminase e de nitrito/nitrato (ON <sup>x</sup> ), em camundongos com pleurisia	57
5.5. Efeito do PK11195 sobre os leucócitos teciduais (pulmão, baço e fígado) em camundongos com pleurisia.....	58
5.6. Efeito do PK11195 sobre os leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de animais tratados com DL-aminoglutatimida na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	64
5.7. Efeito do PK11195 sobre os níveis de leucócitos no sangue de animais tratados com DL-aminoglutatimida na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, 4 e 48 h.....	66
5.8. efeito do PK11195 sobre as concentrações da mieloperoxidase, da adenosina-deaminase e de nitrito/nitrato (ON <sup>x</sup> ), em animais tratados com DL-aminoglutatimida na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, 4 e 48 h.....	69
5.9. Efeito do Ro5-4864 sobre os níveis de leucócitos e exsudato em camundongos com pleurisia.....	71
5.10. Efeito do Ro5-4864 sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia.....	76
5.11. Efeito do Ro5-4864 sobre a permeabilidade vascular em camundongos com pleurisia.....	79
5.12. Efeito do Ro5-4864 sobre as concentrações da mieloperoxidase, da adenosina-deaminase e de nitrito/nitrato (ON <sup>x</sup> ), em camundongos com pleurisia	80
5.13. Efeito do Ro5-4864 sobre os leucócitos teciduais (pulmão, baço e fígado) em camundongos com pleurisia.....	82

5.14. Efeito do Ro5-4864 sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de animais tratados com DL-aminoglutatimida na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.....	87
5.15. Efeito do Ro5-4864 sobre os níveis de leucócitos no sangue de animais tratados com DL-aminoglutatimida na pleurisia induzida pela carragenina 4 e 48 h.....	89
5.16. Efeito do Ro5-4864 sobre as concentrações da mieloperoxidase, da adenosina-deaminase e de nitrito/nitrato (ONx), em animais tratados com DL-aminoglutatimida na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, 4 e 48 h.....	92
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÕES.....	109
8. REFERÊNCIAS .....	111
9. ANEXOS.....	132
9.1. <i>Aprovação pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA)</i> .....	133
9.2. <i>Aceite do trabalho intitulado Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy</i> .....	134

## LISTA DE ABREVIÇÕES

5-HETE	Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico
5-LO	Lipooxigenase
$\alpha_{\chi}\beta_2$	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em granulócitos e monócitos.
$\alpha_1\beta_2$	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em todos os leucócitos.
$\alpha_4\beta_7$	Ligante da molécula de adesão da família das imunoglobulinas (MAdCAM-1)
$\alpha_M\beta_2$	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em granulócitos e monócitos.
$\alpha_v\beta_3$	Ligante da molécula de adesão da família das imunoglobulinas (PECAM-1)
$A_4\beta_1$	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.
$A_4\beta_7$	Molécula de adesão da família das integrinas expressa em linfócitos e eosinófilos.
AA	Ácido araquidônico
ADA	Adenosina-deaminase
$A_1$	Receptor tipo 1 da adenosina-deaminase
$A_{2A}$	Receptor tipo 2A da adenosina-deaminase
$A_{2B}$	Receptor tipo 2B da adenosina-deaminase
$A_3$	Receptor tipo 3 da adenosina-deaminase
ADN	Ácido desoxirribonucléico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANCA	Anticorpo anti-citoplasmático de neutrófilos
ANC	Transportador de nucleotídeo adenina associado ao receptor benzodiazepínico periférico
AST	Aspartato-aminotransferase
ARNm	Ácido ribonucléico mensageiro
Bcl-3	Família de genes relacionados a apoptose
BK	Bradicinina
CAA	Célula apresentadora de antígeno
$Ca^{+2}$	Íon cálcio
C3a	Componente do sistema complemento C3a
C5a	Componente do sistema complemento C5a
C5b	Componente do sistema complemento C5b
C9	Componente do sistema complemento C9
CAM	Moléculas de adesão da família das imunoglobulinas
CD	Células dendríticas
CD102	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas expressa no endotélio
CD106	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas expressa no endotélio

CD11a	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos
CD11b	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em células mielóides e linfócitos CD8 positivos
CD11c	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em células mielóides
CD18	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos
CD26E	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa no endotélio
CD29	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa nos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.
CD31	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em todos os leucócitos, endotélio e plaquetas
CD34	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em células progenitoras hematopoiéticas
CD43	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos, exceto linfócitos B
CD49d	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa nos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos
CD49d/ $\beta_7$	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em linfócitos e eosinófilos.
CD54	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa no endotélio e nos eosinófilos
CD62L	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa em todos os leucócitos
CD62P	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa em células endoteliais e plaquetas
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CGS 21680	Agonista seletivo para o receptor $A_{2A}$ da adenosina
Cl <sup>-</sup>	Íon cloro
COX	Ciclooxigenase
c-Rel	Subunidade do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
DPCPX	antagonista do receptor A1 da adenosina
ELAM-1	Molécula de adesão da família das selectinas, expressa no endotélio
ERG	Elementos relacionados ao receptor glicocorticóide
E-selectina	Selectina tipo E
E.P.M.	Erro padrão da média
ESL-1	Ligante da molécula de adesão do tipo E-selectina
FLC	Fosfolipase C
GABA <sub>A</sub>	Ácido gama amino butírico
GlyCAM-1	Molécula de adesão do tipo integrina, expressa em vênulas
GMP-140	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas

GMP-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GR	Receptor Glicocorticóide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HETE	Ácido hidroxiieicosatetraenóico
HOCl	Ácido Hipocloroso
HOE 140	Antagonista do receptor B <sub>2</sub> da bradicinina
HPETE	Ácido hidroxiperoxieicosatetraenóico
I $\kappa$ B	Proteína associada ao Fator de transcrição nuclear NF-I $\kappa$ B
IB-MECA	Agonista do receptor A <sub>3</sub> da adenosina
ICAM-1	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas
ICAM-2	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em linfócitos, monócitos e células endoteliais vasculares
IL	Interleucina
kDA	Kilo Dalton
LECAM-1	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em todos os leucócitos
LFA-1	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos.
LPAM-1	Molécula de adesão do tipo integrina, expressa em linfócitos e eosinófilos
L-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em todos os leucócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
Mac-1	Molécula de adesão do tipo Integrina composta pelas subunidades CD11b e CD18
MAdCAM-1	Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em células endoteliais da placa de Payer
MCP-1 e 2	Proteína quimioatraente para monócitos
MEL-14Ag	Molécula de adesão do tipo selectina expressa em todos os leucócitos
NPC18884	Antagonista do receptor B <sub>2</sub> da bradicinina
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear NF-kappaB
ON	Óxido nítrico
ONSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
ONS	Óxido nítrico sintase
ONS 1 ou ONSn	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
ONS 2 ou ONSi	Óxido nítrico sintase induzida
ONS 3 ou ONSe	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
p100, p105, p50, p52	Subunidades do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
PADGEM	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas



PAF-acéter	Fator agregante de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adesão do tipo imunoglobulina, expressa em leucócitos, endotélio e plaquetas
PGs	Prostaglandinas
PK11195	Ligante do receptor benzodiazepínico periférico
P-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas
PRAX-1	Proteína associada ao Receptor benzodiazepínico periférico
PSGL-1	Ligante das molécula de adesão P-selectina, expressa em todos os leucócitos
RANTES	Proteína quimioatraente para eosinófilos, monócitos, linfócitos T e basófilos
RBC	Receptor benzodiazepínico central
RBP	Receptor benzodiazepínico periférico
RBzm	Receptor benzodiazepínico mitocondrial
Rel A (p65), Rel B	Subunidades do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
Ro5-4864	Ligante do receptor benzodiazepínico periférico
SNC	Sistema nervoso central
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TTN	Tricontetraneuropeptídeo
TX	Tromboxanos
VCAM-1	Molécula de adesão do tipo imunoglobulina, expressa no endotélio
VDAC	Canal iônico voltagem dependente associado ao receptor benzodiazepínico periférico
VLA-4	Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama da resposta inflamatória.....	03
Figura 2	Interação entre leucócitos e moléculas de adesão.....	10
Figura 3	Estrutura do receptor benzodiazepínico periférico.....	18
Figura 4	Complexo trimérico do receptor benzodiazepínico periférico.....	19
Figura 5	Estrutura química do PK11195.....	22
Figura 6	Estrutura química do Ro5-4864.....	22
Figura 7	Perfil temporal dos leucócitos totais e da exsudação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	25
Figura 8	Efeito do PK11195 (0,01-1,0 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos.....	49
Figura 9	Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado de 0,5 a 4 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos	50
Figura 10	Efeito do PK11195 (0,01-0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos.....	52
Figura 11	Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado de 0,5 a 4 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), ou em duas doses num intervalo de 12 h, na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos.....	53

Figura 12	Efeito do PK11195 (0,01-1,0 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos no sangue em camundongos.....	55
Figura 13	Efeito do PK11195 (0,01-1,0 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos no sangue em camundongos.....	56
Figura 14	Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos.....	57
Figura 15	Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de nitrito/nitrato na cavidade pleural de camundongos.....	58
Figura 16	Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de adenosina deaminase na cavidade pleural de camundongos.....	58
Figura 17	Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular nos pulmões de camundongos.....	59

- Figura 18 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular nos pulmões de camundongos..... 60
- Figura 19 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular da polpa branca e vermelha no baço de camundongos..... 61
- Figura 20 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular da polpa branca e vermelha no baço de camundongos..... 62
- Figura 20 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular no fígado de camundongos..... 63
- Figura 22 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular no fígado de camundongos..... 63
- Figura 23 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutarimida (10 mg/Kg, i.p.), na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%)..... 65

- Figura 24 Efeito do PK11195, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%)..... 66
- Figura 25 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre os níveis de leucócitos no sangue, de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). ..... 68
- Figura 26 Efeito do PK11195, sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%)..... 68
- Figura 27 Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre os níveis de nitrito/nitrato na cavidade pleural, na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.)..... 70
- Figura 28 Efeito do PK11195 sobre os níveis de adenosina deaminase na cavidade pleural, na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.)..... 70
- Figura 29 Efeito do Ro5-4864 (0,01-0,5 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos..... 72

- Figura 30 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado de 0,5 a 4 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos..... 73
- Figura 31 Efeito do Ro5-4864 (0,01-0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos..... 75
- Figura 32 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado de 1 a 4 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), ou em duas doses num intervalo de 12 h, na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos..... 76
- Figura 33 Efeito do Ro5-4864 (0,01-0,5 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos no sangue em camundongos..... 78
- Figura 34 Efeito do Ro5-4864 (0,01-0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de leucócitos no sangue em camundongos..... 79
- Figura 35 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos..... 80

Figura 36	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de mieloperoxidase na cavidade pleural de camundongos.....	81
Figura 37	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de nitrito/nitrato na cavidade pleural de camundongos.....	81
Figura 38	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre os níveis de adenosina deaminase na cavidade pleural de camundongos.....	82
Figura 39	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular nos pulmões de camundongos.....	83
Figura 40	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular nos pulmões de camundongos.....	83
Figura 41	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular da polpa branca e vermelha no baço de camundongos.....	84

- Figura 42 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular da polpa branca e vermelha no baço de camundongos..... 85
- Figura 43 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg, 1%/cav.), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular no fígado de camundongos..... 86
- Figura 44 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses com intervalo de 12 h, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, sobre a organização e morfologia celular no fígado de camundongos..... 86
- Figura 45 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 0,5 h antes) sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%)..... 88
- Figura 46 Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na cavidade pleural de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%)..... 89
- Figura 47 Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 0,5 h antes) sobre os níveis de leucócitos no sangue, de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%)..... 91



Figura 48	Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%).....	91
Figura 49	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre os níveis de mieloperoxidase na cavidade pleural, na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.).....	93
Figura 50	Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre os níveis de nitrito/nitrato na cavidade pleural, na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.).....	94
Figura 51	Efeito do Ro5-4864 sobre os níveis de adenosina-deaminase na cavidade pleural, na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.).....	94
Figura 52	Esquema proposto do mecanismo de ação antiinflamatório dos ligantes do Receptor Benzodiazepínico Periférico.....	110

**LISTA DE TABELA**

Tabela 1 Moléculas de adesão e a interação celular na resposta  
inflamatória..... 09

## RESUMO

**Introdução:** Estudos têm demonstrado o efeito antiinflamatório do PK11195 e do Ro5-4864 em modelos experimentais (TORRES et al., 1999; 2000). Estes dois fármacos são denominados ligantes do receptor benzodiazepínico periférico (RBP) estão localizados em diversos tecidos, em nível periférico. Neste estudo foi utilizado o modelo de pleurisia induzida pela carragenina (Cg, 1%/cav.), em camundongos. Este é um modelo pelo qual apresenta uma resposta inflamatória bifásica (4 e 48 h) importante para avaliação de novos fármacos com propriedades antiinflamatórias.

**Objetivos:** 1) Avaliar o efeito do PK11195 e do Ro5-4864 sobre a resposta inflamatória induzida pela Cg na cavidade pleural de camundongos. Os parâmetros inflamatórios (leucócitos, exsudação, concentrações da mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), óxido nítrico (ON<sup>x</sup>) e permeabilidade vascular) foram estudados 4 e 48 h após a indução da pleurisia, 2) Avaliar se o possível efeito antiinflamatório dos fármacos estudados ocorre devido a síntese esteroidal.

**Materiais e métodos:** Neste protocolo experimental, foram utilizados camundongos albinos suíços de ambos os sexos, pesando entre 18-22g. Todos os animais foram tratados previamente com solução de azul de Evans (25 mg/kg, i.v.) para análise indireta do exsudato, exceto para àqueles experimentos pelo qual, estudou-se as enzimas MPO e ADA, ON<sup>x</sup> e análise histológica. Inicialmente avaliou-se a curva dose, tempo e resposta sobre os parâmetros inflamatórios (leucócitos e exsudação). Após o estabelecimento da melhor dose e o melhor tempo de tratamento prévio dos animais com os fármacos em estudo, avaliou-se o efeito destes sobre as concentrações de MPO, ADA, ON<sup>x</sup>, tanto na primeira (4 h) como na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos.

**Análise estatística:** Os resultados obtidos com a contagem de leucócitos, exsudação, MPO, ADA, ON<sup>x</sup> e permeabilidade vascular foram expressos através da média  $\pm$  e.p.m. A análise estatística para estes parâmetros foi realizada por meio do teste paramétrico ANOVA (Dunnett) complementado, quando necessário pelo teste t de student. A análise histológica foi expressa através de scores (0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado e 3 = abundante). Para este último parâmetro a análise estatística utilizada foi o teste não paramétrico de Man-Whitney. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

**Resultados:** Na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, o PK11195 e o Ro5-4864 inibiram significativamente o influxo de leucócitos ( $P < 0,01$ ), às custas de neutrófilos ( $P < 0,01$ ), a exsudação ( $P < 0,01$ ), os níveis de ON<sup>x</sup> ( $P < 0,01$ ) no lavado pleural e a permeabilidade vascular no pulmão ( $P < 0,01$ ). Além disso, somente o Ro5-4864 foi capaz de inibir significativamente as concentrações da enzima MPO no lavado da cavidade pleural 4 h após ( $P < 0,05$ ). Nesta fase, ambos os fármacos também inibiram os leucócitos no sangue dos animais inflamados ( $P < 0,01$ ). A análise histológica revelou que o PK11195 e o Ro5-4864 inibiram de forma significativa a migração de neutrófilos, mononucleares e edema pulmonar ( $P < 0,01$ ). No baço observou-se também a diminuição de leucócitos, neutrófilos na polpa vermelha, bem como diminuição da hiperplasia da polpa branca ( $P < 0,01$ ). Neste último órgão, os fármacos estudados também aumentaram a apoptose ( $P < 0,01$ ). Já no fígado, observou-se que o PK11195 e o Ro5-4864, diminuíram os neutrófilos e as células de Kupffer ( $P < 0,01$ ). Na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, o PK11195 e o Ro5-4864 inibiram de forma significativa os leucócitos ( $P < 0,01$ ), às custas de mononucleares ( $P < 0,01$ ), e os níveis de ADA no lavado pleural de

camundongos inflamados ( $P < 0,01$ ). A análise histológica revelou que ambos os fármacos inibiram os neutrófilos ( $P < 0,01$ ) e os mononucleares, no pulmão ( $P < 0,01$ ). No baço, tanto o PK11195 como o Ro5-4864 inibiram os neutrófilos e os mononucleares ( $P < 0,01$ ), no entanto, somente o Ro5-4864 diminuiu de forma significativa o centro germinativo, neste órgão ( $P < 0,01$ ). Já no fígado, observou-se que os dois fármacos diminuíram a hiperplasia de células de Küppfer ( $P < 0,01$ ). Finalmente para avaliarmos o possível mecanismo de ação antiinflamatório do PK11195 e do Ro5-4864 utilizamos a  $DL$ -aminoglutatimida neste modelo experimental. Os resultados revelaram que este último fármaco reverteu o efeito antiinflamatório do PK11195 em relação a: exsudação, neutrófilos, mononucleares e níveis de  $ON^x$  no lavado pleural ( $P < 0,01$ ), na pleurisia induzida pela Cg 4 h. Nesta fase, este efeito ocorreu também em relação ao fármaco Ro5-4864 em relação a: neutrófilos, mononucleares, MPO e  $ON^x$  ( $P < 0,01$ ). Na pleurisia induzida pela Cg 48 h, a  $DL$ -aminoglutatimida reverteu os efeitos antiinflamatórios tanto do PK11195 como do Ro5-4864 em relação a: leucócitos, mononucleares, neutrófilos e exsudação na cavidade pleural de camundongos ( $P < 0,01$ ). Além disso, a  $DL$ -aminoglutatimida reverteu também o efeito antiinflamatório do Ro5-4864 em relação aos níveis da ADA ( $P < 0,01$ ). **Conclusão:** Estes resultados revelam que o efeito antiinflamatório tanto do PK11195 como do Ro5-4864 ocorre principalmente sobre o influxo de leucócitos ativados, bem como a inibição de enzimas pró-inflamatórias como MPO e ADA, além do mediador óxido nítrico. Além disso, parece que este efeito antiinflamatório é mediado pela síntese esteroidal. Estudos posteriores devem ser realizados para melhor elucidar o mecanismo de ação antiinflamatória dos ligantes do PBR.

**Palavras-chave:** PK11195, Ro5-4864, Inflamação, Pleurisia, Camundongos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Studies have been demonstrated the anti-inflammatory effect of PK11195 and Ro5-4864 in experimental models (TORRES et al., 1999, 2000). These drugs are known ligands of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and it is localized in several peripheral tissues. In our study we analysed the anti-inflammatory effect of Ro5-4864 and PK11195 in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan (Cg, 1%/cav.). Since the pleurisy caused by Cg exhibits a biphasic response (4 and 48 h), both interval points were chosen to determine the anti-inflammatory effect of PBR ligands. **Objectives:** The aim of this study was 1) To evaluate the effect of PK11195 and Ro5-4864 upon the inflammatory parameters (leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities, nitric oxide (NO<sup>x</sup>) levels or vascular permeability in tissues) induced by Cg in the mouse pleural cavity. The inflammatory parameters were analysed 4 and 48 h after pleurisy induction, 2) To analyse the anti-inflammatory mechanisms of the PBR ligands upon steroidal synthesis. **Materials and methods:** All animals were pretreated with Evans blue dye, except in those experiments that we studied MPO and ADA activities or NO levels and histological analyse. In a first set of experiments we analysed the different doses of these drugs that were able to inhibit both leukocyte influx and exudation. Afterwards, we choose one dose and different periods of time were chosen to analyse the studied parameters described above. Then we analysed the effects of Ro-5 4864 and PK11195 upon MPO and MPO activities, NO levels and vascular permeability, on both phases (4 and 48 h) of the inflammatory response induced by Cg. **Statistic analyses:** The results of leukocytes, exudation, MPO and ADA activities or NO<sup>x</sup> levels, and vascular permeability were expressed by mean  $\pm$  s.e.m. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance, complemented with Dunnett's test or by student's unpaired test when indicated.  $P < 0.05$  was considered indicative of significance. The histological studies were expressed by scores (0= normal, 1= discrete, 2= moderate and 3= abundant). Statistical differences between groups were determined by analysis of variance complemented with Man-Whitney test.  $P < 0.05$  was considered indicative of significance. **Results:** PK11195 or Ro5-4864 significantly inhibited leukocyte influx ( $P < 0.01$ ), due to neutrophils ( $P < 0.01$ ), exudation ( $P < 0.01$ ), NO<sup>x</sup> levels ( $P < 0.01$ ) in the pleural cavity and vascular permeability in the lung ( $P < 0.01$ ) 4 h after pleurisy induction. In this context, Ro5-4864, but not PK11195, inhibited MPO levels in the fluid leakage ( $P < 0.01$ ). Furthermore, both drugs reduced the total leukocyte in the blood 4 h after ( $P < 0.05$ ). The histological analysis showed that PK11195 and Ro5-4864 inhibited neutrophils, mononuclear cells and fluid leakage in the lung ( $P < 0.01$ ). All drugs inhibited white pulp hyperplasia ( $P < 0.01$ ) and total leukocytes and neutrophils on the red pulp in the spleen ( $P < 0.01$ ). On the other hand these drugs increased the apoptosis in the spleen ( $P < 0.01$ ). PK11195 and Ro5-4864, significantly inhibited the Küppfer cells hyperplasia and neutrophil influx in the liver ( $P < 0.01$ ). On the late (48 h) phase both drugs significantly inhibited the leukocytes influx ( $P < 0.01$ ), due to mononuclears ( $P < 0.01$ ) and ADA activities ( $P < 0.01$ ). The histological analyse showed that both drugs significantly decreased the neutrophil and mononuclear influxes in the lung ( $P < 0.01$ ). PK11195 or Ro5-4864, also decreased the neutrophil influx in the spleen ( $P < 0.01$ ). However Ro5-4864, but not PK11195 reduced the germinative center in this organ. Ro-5 4864 and PK11195 decreased the kuppfer cells hyperplasia in the liver ( $P < 0.01$ ). Finally, the pretreated

animals with  $D_L$ -aminoglutethimide showed that  $D_L$ -aminoglutethimide reverted the anti-inflammatory effects of PK11195 upon exudation, neutrophils, mononuclears and  $NO^x$  levels in the fluid leakage ( $P < 0.01$ ), 4 h after.  $D_L$ -aminoglutethimide also reverted the anti-inflammatory effect of Ro5-4864 upon: neutrophils, mononuclears, MPO activity or  $NO^x$  levels in the pleural cavity. In the late phase (48 h)  $D_L$ -aminoglutethimide reverted the anti-inflammatory effects of either PK11195 or Ro5-4864 upon leukocyte, neutrophils and mononuclear influxes or exudation in the pleural activity ( $P < 0.01$ ). Furthermore, the  $D_L$ -aminoglutethimide reverted the anti-inflammatory effect of Ro5-4864, but not PK11195 upon ADA activity ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** These results showed that the anti-inflammatory effects of either PK11195 or Ro5-4864 occur mainly upon these leukocytes and some enzymes that participated of this inflammatory response induced by Cg such as MPO and ADA activities or nitric oxide levels. Furthermore, these anti-inflammatory effects could be mediated by steroidal synthesis. Other studies must be done to clarify the anti-inflammatory properties of the PBR ligands.

**Key-words:** PK11195, Ro5-4864, Inflammation, Pleurisy, Mice.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser caracterizada como um mecanismo complexo iniciado tanto por fatores endógenos (necrose tecidual) bem como fatores exógenos (agentes químicos, físicos, estímulo imunológico como, por exemplo, infecção por microorganismos) (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

O termo inflamação foi descrito no século XVI tendo sido definida como “*the action of setting on fire*”, no entanto, o termo inflamação já era descrito em antigos papiros egípcios e em escritas encontradas na Mesopotâmia há mais de 2000 anos (CONE, 2001).

O avanço no conhecimento sobre a inflamação iniciou-se no século 19, pelo qual pesquisadores como Cohnhein, Metchnikoff e Virchow utilizaram metodologias como a microscopia para o estudo da inflamação. Os resultados obtidos por estes pesquisadores coincidiram com aqueles já definidos por Celsius, no primeiro século depois de Cristo, ou seja, a presença de cinco sinais clínicos denominados de sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, dor, edema, além da perda da função do local lesado (CONE, 2001).

Esses sinais cardiais são conseqüências da ativação de mediadores liberados em nível local e sistêmico promovendo alterações no fluxo sanguíneo, na permeabilidade vascular, na infiltração de células e na liberação de agentes indutores da dor (ALI et al., 1997).

A presença de agentes estranhos ou alguma lesão tecidual serve de estímulo para o início da resposta inflamatória que tem como objetivo a destruição e a eliminação do agente agressor.

O agente invasor é inicialmente reconhecido pelos componentes do sistema imune do organismo, seguido da liberação de mediadores químicos e ativação de diversos tipos de células que se acumulam no sítio da inflamação (ALI et al., 1997).

Como demonstrado na Figura 1, as respostas celulares e vasculares que ocorrem na inflamação são direcionadas e amplificadas por substâncias multifuncionais, dentre elas citam-se: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e seus derivados, que promovem o recrutamento e a ativação de células como, por exemplo, polimorfonucleares, mononucleares, células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, dentre outros (PELAIA et al., 2003). Dentre os mediadores químicos já identificados destacam-se: aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas, sistema complemento (C3a, C5a-C5b-C9) (TURNBERG; BOTTO, 2003), metabólitos do ácido araquidônico (AA), como os produtos da via da ciclooxigenase (COX), incluindo endoperóxidos, prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX) e produtos da via da lipooxigenase (5-LO) (leucotrienos (LT), ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico (HPETE) e hidroxieicosatetraenóico (HETE)) (PARENTE; PERRETTI, 2003), metabólitos do oxigênio, óxido nítrico (ON) (FOLKERTS et al., 2001), citocinas (HOPKINS, 2003), entre outras.



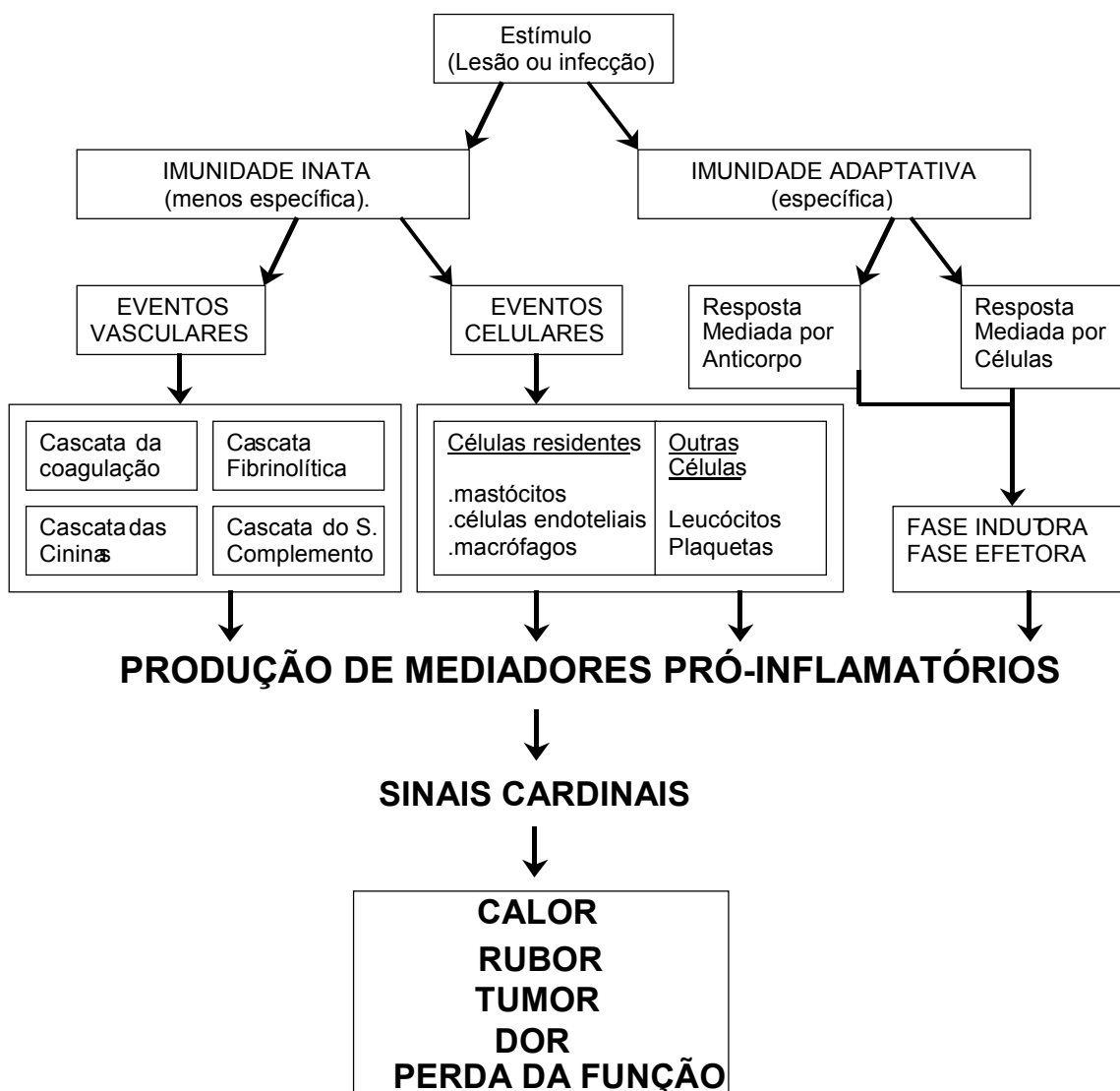


Figura 1 – Diagrama da resposta inflamatória. Adaptada do site [http://www.uic.Edu/labs/mesecar/lecture\\_1.html](http://www.uic.Edu/labs/mesecar/lecture_1.html). Acessado em: 01 de agosto de 2003. S. complemento – Sistema complemento.

A resposta inflamatória possui dois aspectos importantes, a inflamação e o reparo. Independentemente da etiologia do estímulo primário, a inflamação é didaticamente dividida em três etapas: 1) alteração vascular (fluxo/calibre vascular além de um aumento da permeabilidade vascular); 2) extravasamento de leucócitos (quimiotaxia/adesão/transmigração e fagocitose) e 3) reparo tecidual e crescimento celular (SUZUKI et al., 2003).

Inicialmente ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação induzida pela liberação de histamina pelos mastócitos ativados. O

aumento da permeabilidade vascular leva a formação de edema, quimiotaxia celular e aumento no fluxo sanguíneo. Dentre os mediadores relacionados ao aumento da permeabilidade vascular citam-se: histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-acéter, C5a, prostaglandinas ( $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ) e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP)) (HEDQVIST, GAUTAM, LINDBOM, 2000; LECCI et al., 2000), resultando na formação de edema e na perda de proteínas plasmáticas.

Após esta fase inicial da resposta inflamatória, ocorre uma outra etapa caracterizada por migração de leucócitos e de células fagocíticas para o sítio da lesão. A migração leucocitária, processo no qual as células são atraídas para o tecido lesado, denomina-se de quimiotaxia. Este evento é decorrente da liberação de fatores quimiotáticos, como por exemplo, proteínas do sistema complemento e as cininas, que são gerados na corrente sanguínea e encontradas também no sítio da lesão (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS et al., 2001).

Várias células estão envolvidas nesta fase da resposta inflamatória, dentre elas as fagocíticas que são constituídas principalmente de neutrófilos, que fagocitam o agente invasor ou liberam enzimas lisossomais na tentativa de destruir o agente estranho. Caso a inflamação persista, ocorre também, na área lesada, uma infiltração de células do tipo mononucleares, incluindo-se macrófagos e monócitos. Desta forma, com a liberação de mediadores e a ativação celular, ocorre o que denominamos de amplificação da resposta inflamatória (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

Os componentes do sistema complemento, um outro sistema que participa da resposta imune inata, é constituído por uma série de proteínas plasmáticas que quando ativadas são capazes de direta ou indiretamente destruir o

agente invasor por meio da ativação do sistema imune humoral e celular, incluído a quimiotaxia, a fagocitose, a adesão celular e a diferenciação de linfócitos B (WALPORT, 2001 a,b). As principais proteínas deste sistema, que são liberadas no plasma e que participam da quimiotaxia são os componentes do sistema complemento C3a e C5a (FRANGOIANNIS et al., 2001).

Os mastócitos ativados e a indução da agregação plaquetária também resultam na liberação de mediadores que são quimiotáticos tanto para macrófagos quanto para monócitos. Entre os mediadores considerados quimiotáticos, citam-se os prostanóides: PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>, derivados da via da lipoxigenase, 5-HETE, cininas, as substâncias liberadas dos neutrófilos, o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), entre outros (TAN; LUSCINSKAS; HOMER-VANNIASINKAM, 1999).

Simultaneamente, além da geração de fatores quimiotáticos e uma vasodilatação local, ocorrem também mudanças na distribuição dos componentes celulares em relação ao fluxo sangüíneo. Os leucócitos circulantes, no centro da luz vascular, migram nas proximidades da parede do vaso. Além disso, a migração celular é facilitada pela expressão de moléculas de adesão em diferentes tipos de células (JUNG et al., 1998; SIEGELMAN; STANESCU; ESTESS, 2000).

Após estímulos diversos, como lesão tecidual, ocorre um aumento na expressão de moléculas de adesão pelo qual desencadeiam uma maior interação entre o endotélio vascular e as células ativadas. Dentre as células já identificadas que expressam moléculas de adesão estão: os leucócitos, os macrófagos, os fibroblastos, as plaquetas, as células endoteliais, entre outras (JUNG et al., 1998; TAN et al, 1999).

Os fatores quimiotáticos que estimulam tanto os leucócitos como as células endoteliais a expressar as moléculas de adesão também promovem a

adesividade entre estas células, processo este conhecido como rolamento. Nesta fase ocorre uma adesão entre os leucócitos e as células endoteliais (WALZOG et al., 1999; KEVIL, 2003).

A formação de uma interação de alta afinidade entre as células (leucócitos e células endoteliais), permite uma adesão firme. Os leucócitos então iniciam o processo de transmigração, migrando do vaso para o sítio lesado (KEVIL, 2003).

## **1.2 CÉLULAS ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO**

Muitas células participam do sistema de defesa do organismo, porém os neutrófilos e fagócitos mononucleares desempenham a maioria de suas funções na proteção e na manutenção do ambiente biológico interno do organismo. Desta forma, é importante destacarmos a função destes dois tipos celulares (neutrófilos e os mononucleares).

### **1.2.1 Neutrófilos**

São células que não possuem a capacidade de divisão, com uma meia vida de sete dias e que dispõe de substâncias importantes para a eliminação de agentes agressores. Os neutrófilos possuem em seu interior três tipos de grânulos: os grânulos azurófilos que contém proteases e enzimas hidrolíticas, defensinas, mieloperoxidase, entre outros. Os grânulos específicos o qual contém entre outros elementos, apolactoferrina, colagenase e enzimas, que ativam a função do componente C5a do sistema complemento. Finalmente, os grânulos que contém gelatinase e exibem receptor CD11/18 na membrana, são essenciais para a adesividade da célula. O citoesqueleto do neutrófilo é um complexo sistema de

microfilamentos e microtúbulos que proporcionam a célula, uma grande habilidade na locomoção além de um movimento ordenado (BOXER, 2001).

Durante o metabolismo oxidativo, que é produzido por neutrófilos ativados, a mieloperoxidase, situada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, promove a geração de ácido hipocloroso (HOCl) que está implicado na fagocitose (agente bactericida e citotóxica) (MUTZE et al., 2003).

### **1.2.2 Mononucleares**

As células mononucleares do tipo monócitos e macrófagos possuem uma função central na defesa contra patógenos, além de participar de vários tipos de inflamação crônica. Além disso, podem atuar como células apresentadoras de antígenos (CAA) embora com menor capacidade que as células dendríticas (CD) (HASHIMOTO et al., 2000; ROCCA et al., 2002). Ambos, monócitos e macrófagos são células similares, porém não são idênticas. Os monócitos migram ao acaso para vários órgãos e cavidades do corpo, onde então podem se diferenciar em macrófagos. Isto ocorre em função dos vários mediadores inflamatórios liberados durante a inflamação ou a infecção local. Já os macrófagos, são células residentes que podem variar em sua morfologia, função e propriedade dependendo do tipo de tecido em que se encontra (HASHIMOTO et al., 1999).

### **1.3 MOLÉCULAS DE ADESÃO**

Estímulos inflamatórios ativam as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão (ver Tabela 1), que estão relacionadas à captura dos leucócitos circulantes por meio do contato entre estes e o endotélio, possibilitando assim uma maior adesão (XU et al., 2000; MULLER, 2003).

A migração leucocitária da circulação sanguínea para o tecido lesado é um complexo sistema formado por inúmeras etapas que envolvem uma seqüência de reações químicas e interações entre as moléculas de adesão expressas nos leucócitos e nas células endoteliais (CONRAN et al., 2003).

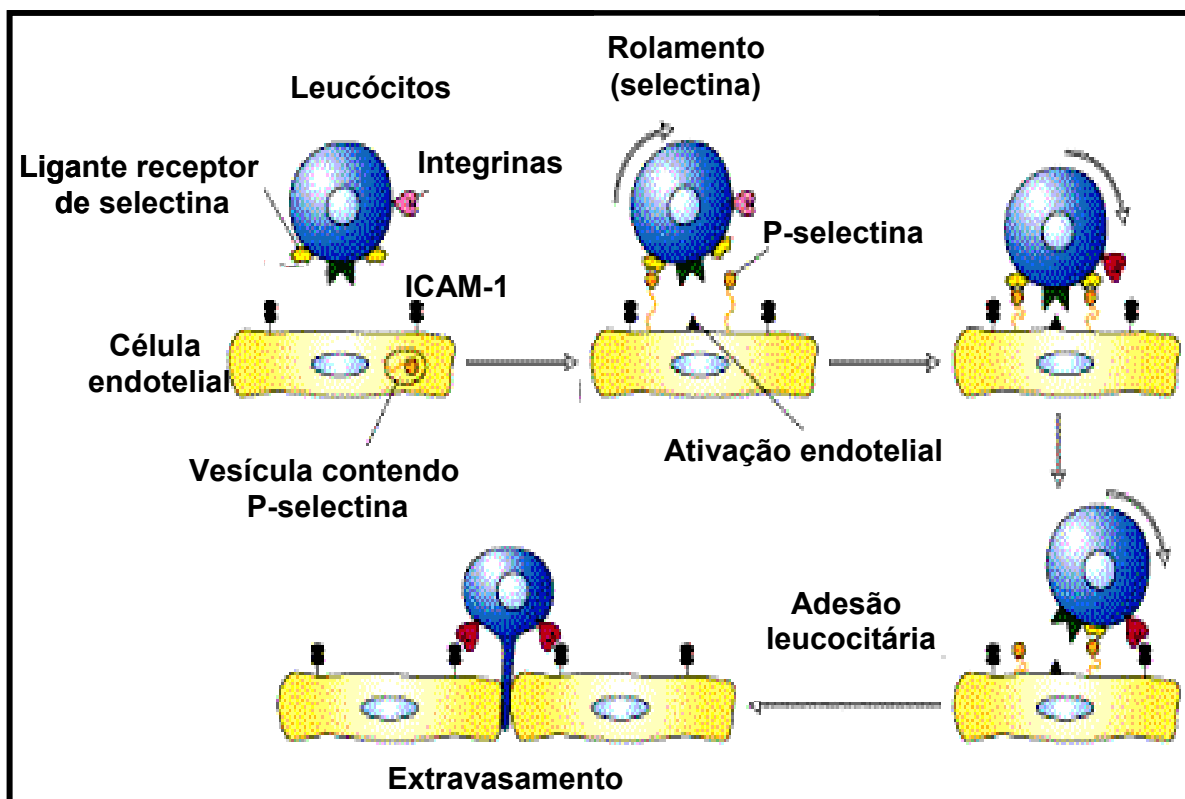
Inicialmente ocorre uma fraca interação entre os leucócitos circulantes e a parede interna dos vasos (rolamento), processo que é mediado pela família de moléculas de adesão denominada de selectinas.

A seguir, ocorre aderência firme entre os leucócitos e a parede interna dos vasos com a participação principalmente das moléculas de adesão do tipo integrinas e a superfamília das imunoglobulinas. Após esta etapa, os leucócitos são capazes de atravessar a parede dos vasos em direção ao tecido lesado, etapa esta também conhecida como transmigração endotelial (PANÉS, 1999; MULLER, 2002) (Figura 2).

**Tabela 1** – Moléculas de adesão e sua interação celular na resposta inflamatória.

<b>INTERAÇÕES ENDOTÉLIO-LEUCÓCITOS - PROTEÍNAS DE ADESÃO</b>				
Moléculas de Adesão	Designação Alternativa	Localização	Ligante	Função
<b>Família das Selectinas</b>				
L-selectina	ELAM-1, LECAM-1, MEL-14Ag, CD62L	todos leucócitos	P-selectina, E-selectina, GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1	Rolamento
P-selectina	PADGEM, GMP-140, CD62P	células endoteliais, plaquetas	L-selectinas, PSGL-1	Rolamento
E-selectina	ELAM-1, CD26E	células endoteliais	L-selectinas, PSGL-1, ESL-1	Rolamento
<b>Família das Integrinas</b>				
$\alpha_1\beta_2$	CD11a/CD18, LFA-1	todos leucócitos	ICAM-1, ICAM2	Adesão, transmigração
$\alpha_M\beta_2$	CD11b/CD18, Mac-1	granulócitos, monócitos	ICAM-1, C3bi, fibrinogênio	Adesão
$\alpha_X\beta_2$	CD11c/CD18	granulócitos, monócitos	VCAM-1, fibronectina	Adesão
$\alpha_4\beta_1$	CD49d/CD29/VLA-4	linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos	VCAM-1, fibronectina	Adesão
$\alpha_4\beta_7$	CD49d/ $\beta_7$ , LPAM-1	linfócitos, eosinófilos	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectina	Adesão
<b>Superfamília das Imunoglobulinas</b>				
ICAM-1	CD54	endotélio, monócitos	LFA-1, Mac-1, CD43	Adesão, transmigração
ICAM-2	CD102	Endotélio	LFA-1	Adesão, transmigração
VCAM-1	CD106	Endotélio	VLA-4	Adesão
PECAM-1	CD31	endotélio, leucócitos, plaquetas	PECAM-1 (hemofílico) $\alpha_V\beta_3$ (heterofílico)	Adesão, transmigração
MAdCAM-1	-	Endotélio	L-selectina, $\alpha_4\beta_7$	Adesão, transmigração

Moléculas de adesão (CAM); ELAM-1 (Molécula de adesão da família das selectinas expressa no endotélio); ESL-1 (Ligante da molécula de adesão do tipo E-selectina); GlyCAM-1 (Molécula de adesão do tipo integrina, expressa em vênulas); GMP-140 (Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas); ICAM (molécula de adesão do tipo imunoglobulina); LAM (molécula de adesão do tipo selectina); LECAM-1 (Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em todos os leucócitos); LFA-1 (Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em todos os leucócitos); LPAM-1 (Molécula de adesão do tipo integrina, expressa nos linfócitos e eosinófilos); MadCAM-1 (Molécula de adesão da família das imunoglobulinas, expressa em células endoteliais da placa de Peyer); MEL-14Ag (Molécula de adesão do tipo selectina expressa em todos os leucócitos); PADGEM (Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas); PECAM-1 (Molécula de adesão do tipo imunoglobulina, expressa nos leucócitos, endotélio e plaquetas); PSGL-1 (Ligante das moléculas de adesão P-selectina, expressa em todos os leucócitos); VCAM-1 (Molécula de adesão do tipo imunoglobulina, expressa no endotélio); VLA-4 (Molécula de adesão da família das integrinas, expressa em monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos). Adaptado de KRIEGLSTEIN; GRANGER, 2001.



**Figura 2** – Interações entre os leucócitos e a expressão das moléculas de adesão no vaso. Rolamento, adesão, migração transendotelial, selectinas, integrinas e ligantes das moléculas de adesão. Adaptado de: <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mfjfam/2MCD/2MCD-29-30.htm>. Acesso em: 10 agosto de 2003.

## 1.4 MEDIADORES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO

### 1.4.1 Metabólitos do ácido araquidônico

O ácido araquidônico (AA) é liberado da membrana lipídica após vários estímulos, tais como: físico, químico, citocinas, dentre outros. A seguir, o AA é mobilizado da membrana fosfolipídica pela ação de fosfolipases liberando uma variedade de metabólitos biologicamente ativos (ROCCA; FITZGERALD, 2002). Todas as células são capazes de liberar AA, porém os metabólitos formados são altamente específicos, em nível celular. Como derivam de um ácido graxo eicosanóico, esses compostos: tromboxano  $A_2$ , prostaglandinas, epoxigenases, leucotrienos e lipoxina são coletivamente denominados de eicosanóides.

O AA livre pode ser metabolizado pela enzima 5-lipooxigenase (5-LO) em  $LTA_4$  (PENROSE; AUSTEN; LAM, 1999) ou por uma das isoformas da



ciclooxigenase (COX; prostaglandina endoperoxidase sintase) em  $PGH_2$ , (SMITH, 1992; GRIFFITH, 1999).

Existe pelo menos duas isoformas conhecidas da COX: COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, pela qual modula processos fisiológicos tais como: geração de  $TxA_2$  por plaquetas e prostanoídes envolvidos na função citoprotetora da mucosa gástrica e renal. Em contrapartida, a COX-2 possui função de destaque na inflamação e proliferação celular (SMITH; LANGENBACH, 2001). Segundo TAK e FIRESTEIN (2001), o gene COX-2 é controlado pela ativação do fator de transcrição *NF-kappaB/Rel* em diferentes tipos de células em resposta a estímulos pró-inflamatórios, tais como, lipopolissacarídeo (LPS), interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (*TNF*)- $\alpha$ , entre outros

Os prostanóides medeiam uma enorme variedade de interações em processos fisiológicos e patológicos envolvidos na homeostasia, na trombose, na filtração glomerular e no balanço hidrostático, na ovulação, na implantação embrionária e desenvolvimento, na iniciação do trabalho de parto/aborto, na inflamação e modulação de respostas imunológicas, entre outros (ROCCA; FITZGERALD, 2002). Outros produtos liberados a partir do AA incluem os ácidos hidroieicosatetraenóico (HETEs), lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienos e isoprostanos que também contribuem para modular a resposta inflamatória (SERHAN; OLIW, 2001).

#### **1.4.2 Citocinas**

As citocinas são pequenas proteínas, com peso molecular de 8 a 40 kDa, que podem ser produzidos em todos os tecidos e pela maioria das células dos

sistemas imune inato e adaptativo (CHICHE et al., 2001). Estas são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos. Em geral atuam localmente, de modo parácrino ou autócrino, pela ligação a receptores de alta afinidade nas células-alvo. Algumas citocinas também podem ser produzidas em quantidades suficientes para circular e exercer funções endócrinas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

As citocinas estão sendo particularmente associadas com a imunidade, visto que, participam da regulação do sistema imune inato e adaptativo (GHERARDI; RAMIREZ; ESTEBAN, 2003), regulam o crescimento e a diferenciação celular (REDONDO, 2000), bem como influenciam na implantação do embrião e no desenvolvimento fetal (CHOBOTOVA et al., 2002) e ainda podem ser importantes em doenças auto-imunes (MULLER, 2002).

#### **1.4.3 Óxido nítrico (ON)**

O óxido nítrico (ON), está implicado em processos fisiológicos e patológicos, tais como: vasodilatação, inflamação aguda e crônica (SALERNO et al., 2002). O ON é uma molécula formada pela oxidação da L-arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (ONS) (MATSUDA, 2003). Após ser gerado, difunde-se pelas células e ativa a guanilato ciclase solúvel, resultando na formação do monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina (GMPc) que na musculatura lisa resulta em relaxamento (LINCOLN; KOMALAVILAS, 2000). Existem pelo menos três isoformas da óxido nítrico sintase, cada uma com funções e características distintas: duas isoformas constitutivas e uma induzida. A isoforma constitutiva (ONS) é expressa em células neuronais (ONS<sub>n</sub> ou ONS<sub>1</sub>) e células endoteliais (ONS<sub>e</sub> ou ONS<sub>3</sub>), são permanentemente ativas, gerando baixas concentrações de ON, além da atividade enzimática ser regulada por fluxos intracelulares de cálcio. De outra maneira, a

expressão da isoforma induzida (ONSi ou ONS2) ocorre em resposta a estímulos inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento em células alvo que liberam altos níveis de ON durante a inflamação (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; KNOWLES; MONCADA, 1994; WITTE et al., 2002).

Estudos relacionados com a ONSi demonstram seu envolvimento na fisiopatologia das doenças inflamatórias como por exemplo: doenças neurodegenerativas (SHARMA; EBADI, 2003), rejeição em transplantes (MITTERBAUER et al., 2003), diabetes (HENNINGSSON; SALEHI; LUNDQUIST, 2002), glomérulo nefrite (CHERTIN et al., 2002), sepsis (AVONTUUR; BUIJK; BRUINING, 1998), doenças das vias aéreas (HANSEL et al., 2003), cirrose hepática (MOHAMMED et al., 2003), entre outras.

## 1.5 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR

O fator de transcrição nuclear-kappa B (*NF-kB*) é um regulador importante na expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias, quemocinas, moléculas de adesão, além de mediadores envolvidos na inflamação (TAK; FIRESTEIN, 2001).

Nos mamíferos, já foram identificadas 5 proteínas que fazem parte da família *NF-kappa B*: p50, Rel A (p65), c-Rel, p52 e a Rel B. Cada membro desta família pode formar homodímeros, bem como heterodímeros (LI; VERMA, 2002).

Inicialmente, a função fisiológica do *NF-kappa B* foi descrita primeiramente como sendo um regulador da expressão da cadeia leve das imunoglobulinas (cadeia kappa) em células B. Hoje em dia, sabe-se que o *NF-kappa B* pré-existe no citoplasma na maioria das células de origem mesenquimal na sua forma inativada, ligada a proteínas inibitórias específicas denominadas de IκB

(GHOSH; MAY; KOPP, 1998; KARIN; BEM-NERIAH, 2000). A família I $\kappa$ B consiste de várias proteínas como: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100 e p105. Destas, as mais importantes destacam-se: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; YAMAZAKI; MUTA; TAKESHIGE, 2001).

A partir de um estímulo pró-inflamatório, o *NF- $\kappa$ B* libera-se das proteínas inibitórias (I $\kappa$ B), desloca-se para o núcleo onde se liga a seqüências promotoras de genes, produzindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios (HANDEL; NGUYEN; LEHMANN, 2000), incluindo moléculas de adesão, enzimas, citocinas, entre outros (CHRISTMAN; SADIKOT; BLACKWELL, 2000).

## 1.6 ENZIMAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

### 1.6.1 Mieloperoxidase

Uma das principais enzimas armazenadas nos grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos é a hemoproteína mieloperoxidase. Esta corresponde a 5% do peso seco dos neutrófilos (KLEBANOFF, 1999). Durante a ativação dos neutrófilos esta enzima é liberada dos fagossomos para o espaço extracelular, onde irá reagir com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é derivado do metabolismo respiratório dos neutrófilos, catalisando então a formação de potentes agentes microbicidas como ácido hipocloroso (HOCl) e outras espécies oxidativas (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000).

Um distúrbio autossômico recessivo, promovendo uma deficiência de mieloperoxidase, constitui o distúrbio hereditário mais comum da função dos neutrófilos. Sua estimativa de freqüência varia de 1 em cada 4000, ainda assim, do ponto de vista clínico é uma deficiência silenciosa não havendo necessidade para o tratamento (BOXER, 2001).

Estudos demonstram o envolvimento desta enzima, bem como a formação de anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) (XIAO et al., 2002) em diversas patologias como: leucemia mielóide (MATSUO et al., 2003), glomerulonefrite (VIZJAK et al., 2003) e doença de Alzheimer (COMBARROS et al., 2002).

### 1.6.2 Adenosina-deaminase

A enzima adenosina-deaminase (ADA) está envolvida no metabolismo das purinas, onde cataliza a desaminação hidrolítica da adenosina e 2'-deoxiadenosina para inosina e 2'-deoxiinosina, respectivamente, sendo distribuída amplamente nos tecidos humanos (YONEYAMA et al., 2002).

A adenosina é liberada de células ativadas sendo gerada pela degradação metabólica após a liberação do ATP. Seus efeitos são amplos e pleiotrópicos e estão relacionados com diferentes tipos de receptores já caracterizados farmacologicamente: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (FREDHOLM et al., 2001).

Estes receptores são constituídos por sete glicoproteínas transmembranas acoplados a proteína G e são distribuídos amplamente no organismo. Os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> estão relacionados à atividade da adenilato ciclase e quando estimulados aumentam a concentração da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) enquanto que a estimulação dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> diminui a concentração da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e os níveis de Ca<sup>+2</sup> intracelular, por uma via envolvendo a ativação da fosfolipase C (PLC) (ABBRACCHIO et al., 1995; FREDHOLM et al., 2001).

Outros estudos envolvendo a adenosina relataram o seu envolvimento no estímulo ou na inibição da liberação de fatores angiogênicos dependendo do tipo de

célula estudada (BURNSTOCK, 2002; FEOKTISTOV et al., 2002). Além disso, demonstrou-se que a adenosina altera a proliferação de muitos tipos de células. Estudos utilizando concentração micromolar demonstraram que esta enzima é capaz de inibir a proliferação de células tumorais e aumentar a proliferação de células normais, tais como células de medula ou fibroblastos (FISHMAN; BAR-YEHUDA; VAGMAN, 1998; FISHMAN et al., 2000 a,b). Outros estudos demonstraram que a adenosina induz a apoptose em células leucêmicas HL60 (melanoma humano A375) e de astrocitomas humanas. Este efeito parece ser mediado pela ação intracelular da adenosina do que através de sua ação em receptores de superfície (TANAKA et al., 1994; ABBRACCHIO et al., 2001; MERIGHI et al., 2002).

### **1.7 RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO PERIFÉRICO**

Muitas são as nomenclaturas utilizadas na literatura para a designação do receptor benzodiazepínico periférico, dentre elas: receptor benzodiazepínico periférico (RBP), benzodiazepínico mitocôndrial (RBzm) e ômega 3 ( $\omega_3$ ), porém sua nomenclatura oficial ainda não está definida (O'HARA et al., 2003).

Este receptor foi primeiramente descrito em rim de rato como sendo um sítio com alta afinidade pelo diazepam (BRAESTRUP; SQUIRES, 1977). Desde então, ficou sendo conhecido por receptor benzodiazepínico periférico (RBP).

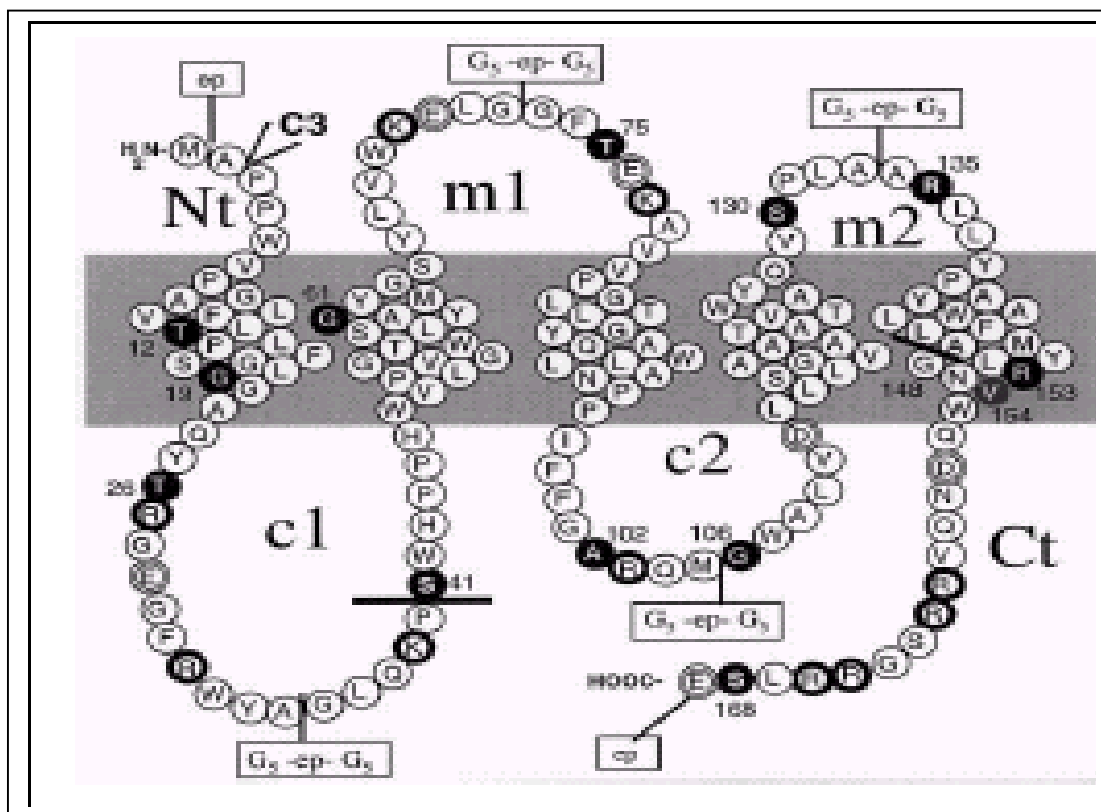
De fato, os primeiros estudos farmacológicos para a caracterização deste receptor foram realizados utilizando-se fármacos do tipo benzodiazepínicos. A localização destes receptores em tecidos periféricos refletiu diretamente na sua nomenclatura inicial, ao contrário do receptor expresso exclusivamente no sistema nervoso central (SNC), que é denominado de receptor benzodiazepínico central (RBC).

Apesar destes receptores (RBP e RBC) terem como semelhança a afinidade com os fármacos benzodiazepínicos, eles diferem entre si farmacologicamente, anatomicamente, estruturalmente e fisiologicamente (CASELLAS; GALIEGUE; BASILE, 2002).

O receptor benzodiazepínico central, pelo qual os benzodiazepínicos interagem, são sítios ligantes associados a um complexo macromolecular do receptor ácido aminobutírico (GABA<sub>A</sub>). Agonistas benzodiazepínicos ligam-se na subunidade  $\alpha$  do receptor GABA<sub>A</sub> facilitando a corrente de cloro (Cl<sup>-</sup>) gerando uma hiperpolarização da membrana sináptica, aumentando o efeito inibitório do GABA (OLSEN; HOMANICS, 2000).

Estudos de biologia molecular utilizando sondas de ADN (ADNc), permitiram a clonagem do RBP em alguns tecidos de animais como: rato (SPRENGEL et al., 1989), camundongos (GARNIER et al., 1994), boi (PAROLA; YAMAMURA; LAIRD, 1993) e homem (RIOND et al., 1991), demonstrando uma seqüência de aminoácidos homóloga de 80% entre os receptores clonados. Além disso, não apresentaram homologia na seqüência de aminoácidos com o RBC (PAROLA; YAMAMURA; LAIRD, 1993).

O RBP é uma proteína de 18 kDa que consiste em 169 aminoácidos sendo altamente hidrofóbico e rico em triptofano (CASELLAS; GALIEGUE; BASILE, 2002). Estudos analisando o receptor de forma tridimensional revelam que o RBP possui uma estrutura de  $\alpha$  hélice separado por uma dupla membrana lipídica (Figura 3) (BERNASSAU et al., 1993; JOSEPH-LIAUZUN et al., 1998).

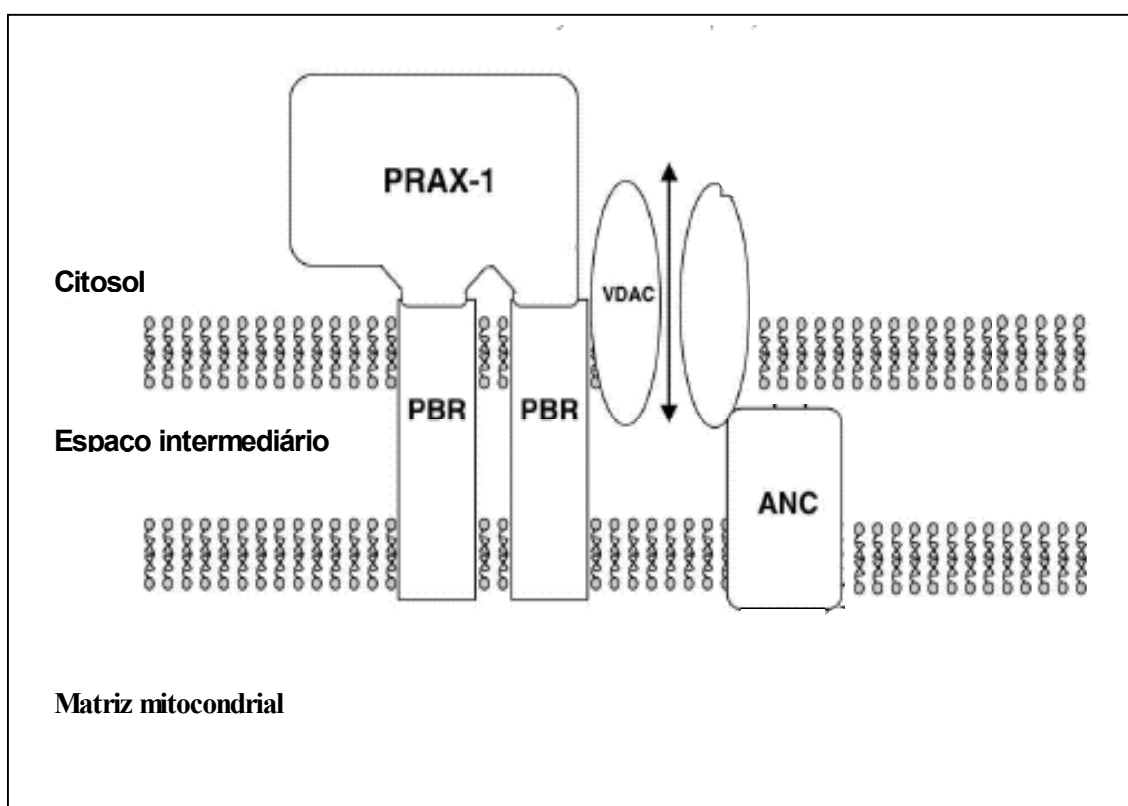


**Figura 3** – Estrutura do receptor benzodiazepínico periférico. A seqüência primária demonstrada é de um receptor benzodiazepínico periférico híbrido de boi (b) e humano (h). Esta seqüência é compreendida por: RBPb (aminoácidos 1-41), RBPh (aminoácidos 42-147) e RBPb (aminoácidos 148-169) e com Val-154 (círculos pretos). As linhas indicam pontos de fusão. *c1* e *c2* indicam as alças citoplasmáticas extramitocôndriais, *m1* e *m2* para as alças intramitocôndriais, *Ct* e *Nt* para os domínios carboxil e amino-terminal, respectivamente. A posição da inserção do epitopo *c-Myc* (*cp*) são mostradas;  $G_3$  significa 5 resíduos de glicina. As posições de inserção da cisteína (C3) e reagrupamento também são observados (círculos marcados). (JOSEPH-LIAUZUN et al, 1998).

O RBP possui um sítio ligante para isoquinolina (LACAPÉRE et al., 2001), está sendo associado com outras proteínas localizadas tanto na parte externa como interna da membrana mitocondrial ou no citosol (LACAPÉRE; PAPADOPOULOS, 2003), formando um complexo trimérico. Uma destas proteínas possui 32 kDa e é denominada de canal iônico voltagem dependente (VDAC), onde foi demonstrado que VDAC aumenta a afinidade do RBP aos benzodiazepínicos, em células de tumor de Leydig, em camundongos (GARNIER et al., 1994). O terceiro componente deste trímero é um transportador de nucleotídeo adenina (ANC) de 30 kDa, pelo qual a função neste complexo ainda não está definida (LACAPÉRE et al., 2001). Além



disso, novas proteínas associadas ao RBP estão sendo identificadas como a PRAX-1, que é uma proteína de 240 kDa e está localizada no citoplasma interagindo com RBP na mitocôndria. A função da PRAX-1 até o momento não está bem definida, mas acredita-se que esteja relacionada na modulação da função do RBP (GALIEGUE et al, 1999; CASELLAS; GALIEGUE; BASILE, 2002). Outra proteína de 10 kDa, também associada ao RBP, está localizada na fração mitocôndrial, porém ainda não está identificada (Figura 4) (BLAHOS; WHALIN; KRUEGER, 1995).



**Figura 4** – Complexo trimérico formado pelo PBR. PBR (receptor benzodiazepínico periférico); VDAC (canal iônico dependente de voltagem); ANC (carregador do nucleotídeo adenina); PRAX-1 (Proteína-1 associada ao PBR) Retirado e adaptado de: CASELLAS; GALIEGUE; BASILE, 2002.

Apesar da localização primária do RBP ter sido encontrada na membrana externa da mitocôndria (ANHOLT et al., 1985a; WOODS; WILLIAMS, 1996), evidências demonstram que sua presença não está restrita nesta organela. O receptor benzodiazepínico periférico também foi encontrado em membranas plasmáticas de eritrócitos, que são desprovidas de mitocôndria (OLSON et al., 1988;

O'BEIRNE; WOODS; WILLIAMS, 1990) e também no núcleo de células tumorais (HARDWICK et al., 1999).

Estudos demonstram que a densidade do receptor benzodiazepínico periférico pode ser modulada por condições tanto fisiológicas como patológicas. Devido ao RBP ser expresso em grandes quantidades nos tecidos endócrinos, a densidade deste receptor pode variar de acordo com alterações hormonais (CASELLAS; GALIEGUE; BASILE, 2002). No ovário, a expressão do RBP está aumentada após a ovulação. Outro exemplo ocorre na glândula pituitária, pela qual a densidade do RBP diminui drasticamente nos testículos, ovários e adrenal de ratos hipofisectomizados (ANHOLT et al, 1985b; CAVALLARO et al, 1992). Além disso, foi também observada uma maior densidade do RBP em diferentes tecidos neoplásicos, como por exemplo: carcinoma e adenocarcinoma de ovário humano (KATZ et al., 1990; KATZ; EITAN; GAVISH, 1990).

De todas as funções atribuídas ao RBP, talvez a melhor caracterizada é em relação a esteroidogênese, visto que este receptor é um componente funcional que atua como mediador na transferência do colesterol do citosol celular para dentro da membrana mitocondrial (BESMAN et al., 1989; PAPADOPOULOS et al., 1997), sendo esta a etapa inicial para a biossíntese de esteróides.

É importante comentar que estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que ligantes do RBP estimulam a biossíntese de esteróides. Em estudos, *in vitro*, com mitocôndria isolada, os ligantes do RBP estimularam a produção de pregnolona (MUKHIN et al., 1989; PAPADOPOULOS et al., 1990). Nos estudos, *in vivo*, verificou-se que o diazepam aumentou os níveis de testosterona plasmático, no homem (ARGUELLES; ROSNER, 1975) e os níveis de corticosterona, em ratos (LAZZARINI et al., 2003). Além disso, ligantes com alta afinidade ao RBP

aumentaram os níveis plasmáticos de glicocorticóides, em ratos normais (CALOGERO et al., 1990) e hipofisectomizados (CAVALLARO et al., 1992).

Além da participação na biossíntese de esteróides, o RBP parece estar envolvido em outras funções como, por exemplo: na proliferação celular (ALHO; VARGA; KRUEGER, 1994), na imunomodulação (ZAVALA, 1997), na biossíntese do heme (BASILE; GAMMAL, 1988) e na apoptose (HIRSCH et al., 1998), entre outros.

## **1.8 LIGANTES DO RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO PERIFÉRICO**

### **1.8.1 Ligantes endógenos**

Moléculas endógenas que possuem afinidade ao receptor benzodiazepínico periférico são também consideradas ligantes do RBP, dentre elas, encontra-se o inibidor da ligação do diazepam (DBI) que é um polipeptídeo de 11 kDa contendo 86 aminoácidos. Essa molécula foi originariamente identificada pelo fato de inibir a ligação do [<sup>3</sup>H] diazepam no cérebro e a ativação do canal de Cl<sup>-</sup> ativado pelo GABA<sub>A</sub>. Como característica, esta molécula possui baixa afinidade pelo receptor RBP e RBC (GUIDOTTI et al., 1983). Além disso, o DBI também pode ser clivado e gerar vários fragmentos biologicamente ativos. Um deles é o Tricontetranuropeptídeo (TTN), o qual tem a mesma afinidade pelo receptor periférico como o DBI, porém é mais seletivo. Outros ligantes endógenos são as porfirinas (protoporfirina IX, mesoporfirina IX, deuteroporfirina IX e hemina) que exibem alta (nM) afinidade pelo RBP (VERMA; NYE; SNYDER, 1987).

### **1.8.2 Ligantes sintéticos do RBP (PK11195 e Ro5-4864)**

O desenvolvimento de novos compostos sintéticos, como os ligantes do receptor benzodiazepínico periférico, tem como objetivo inicial, caracterizar as

funções farmacológicas e posteriormente as funções terapêuticas de ativação deste receptor. Dentre os vários compostos sintéticos já desenvolvidos como ligantes do PBR, o PK11195 e o Ro5-4864 estão bem caracterizados.

O PK11195 (1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolina) é um fármaco com alta afinidade pelo receptor benzodiazepínico periférico ( $K_D < 20$  nM) (Figura 5) (LE FUR et al., 1983).

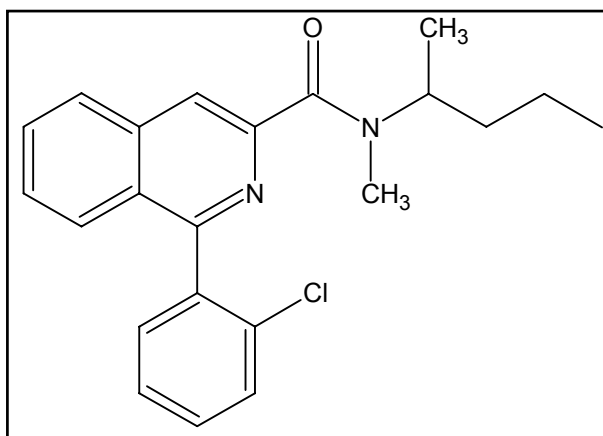


Figura 5 – Estrutura química do ligante do receptor benzodiazepínico periférico: PK11195.

O Ro5-4864, um composto derivado do diazepam, demonstra uma afinidade nanomolar ao RBP e micromolar ao receptor GABA<sub>A</sub> (SYAPIN; SKOLNICK, 1979) (Figura 6).

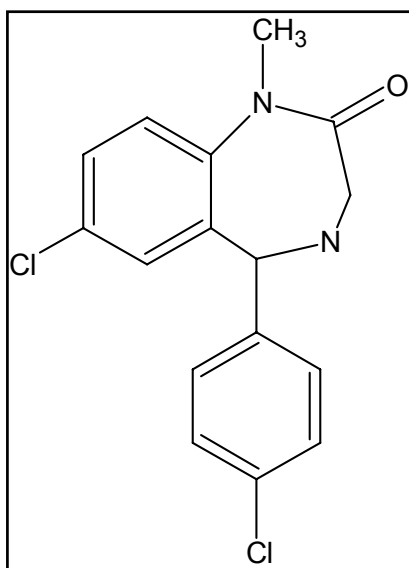


Figura 6 – Estrutura química do ligante do receptor benzodiazepínico periférico: Ro5-4864.

Vários estudos demonstram o efeito antiinflamatório dos ligantes do receptor benzodiazepínico periférico. Dentre eles pode-se citar o efeito do diazepam (10 mg/Kg) na inibição da exsudação, no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, em ratos (LAZZARINI et al., 2003). Outros estudos realizados com o PK11195 demonstram que na dose de 0,01 mg/Kg, este fármaco produz um efeito anti-edematogênico, ao passo que na dose de 0,5 mg/Kg promove, além de um efeito anti-edematogênico, um efeito anti-noceptivo, no modelo de artrite induzido pela LPS, em ratos (BRESSAN et al., 2003). Além disso, outros estudos demonstram que tanto o PK11195 como o Ro5-4864, ambos na dose de 0,1 mg/Kg, inibiram o edema, no modelo de pata induzido por diferentes mediadores inflamatórios (histamina, substancia P, bradicinina, prostaglandina E<sub>2</sub>) no modelo de edema de pata, em camundongos (TORRES et al., 2000). Esses mesmos fármacos, na dose de 0,1 mg/Kg, também foram capazes de inibir a migração de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares, bem como a inibição na liberação de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-13 (IL-13), no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos (TORRES et al., 2000).

## **1.9 MODELO EXPERIMENTAL**

### **1.9.1 Modelo da pleurisia induzida pela carragenina**

Diversos modelos de inflamação, utilizando animais de diferentes espécies, são utilizados para avaliar fármaco com potencial para o tratamento de doenças inflamatórias. Isto se deve ao fato que apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, a etiologia e 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.

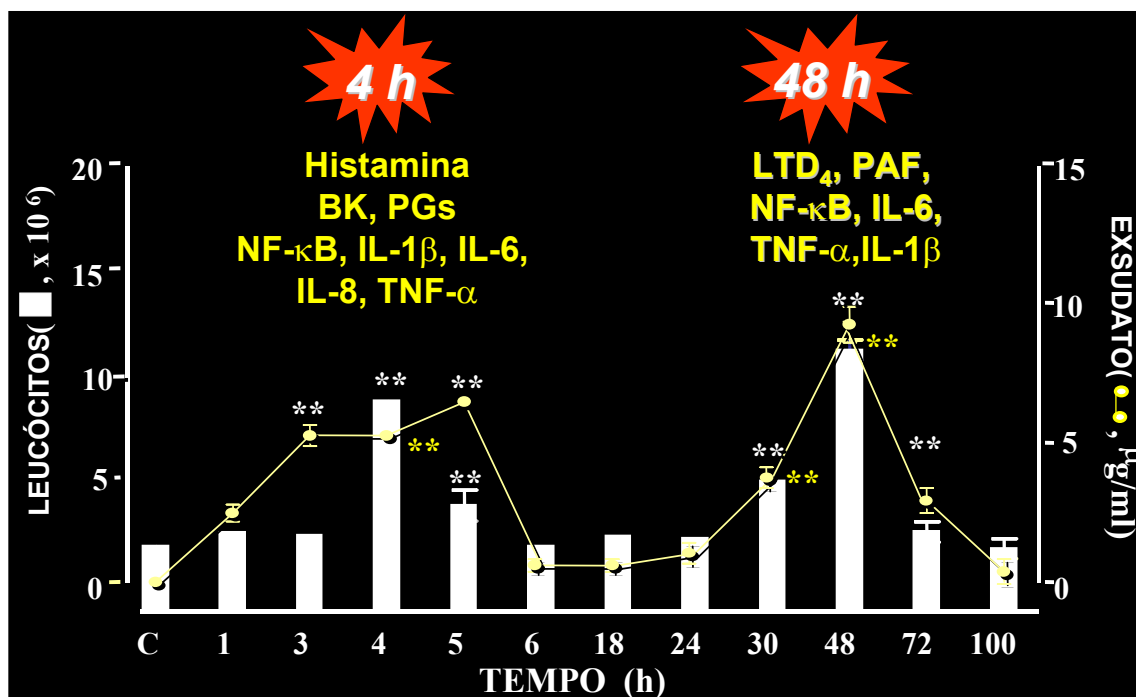
Esforços são realizados no sentido de identificar modelos experimentais apropriados para cada tipo de reação inflamatória como asma brônquica, artrite reumatóide e retocolite ulcerativa, entre outros. Protocolos experimentais pelo qual o processo inflamatório é induzido agudamente são utilizados para estudos desta reação abordando, entre outros, a participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares, além de possibilitar a avaliação de fármacos com potencial antiinflamatório. Entre eles cita-se: pleurisia, indução de edema de pata, bolsa de ar no dorso, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (YAMAMOTO et al., 1975; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985). Com o desenvolvimento deste modelo foi possível então fazer uma avaliação não só do extravasamento de líquido como a migração de células induzidas por diversos agentes flogísticos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002), observar a participação de citocinas (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001, 2002), enzimas e mediadores químicos (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; DALMARCO et al., 2002).

O modelo da pleurisia possui vantagens em relação à do edema de pata, pois a partir da coleta do lavado na cavidade pleural é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional da pleurisia é a fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. Além disso, diversos

experimentos, utilizando novos fármacos, são realizados com objetivo de avaliar uma possível atividade antiinflamatória nas vias aéreas de animais (DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002).

Como descrito na Figura 7, o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, apresenta um modelo de resposta inflamatória bifásica, na qual a primeira fase ou fase inicial ocorre 4 h após a administração da Cg (1%/cav.). Esta fase apresenta como característica um aumento da exsudação e de leucócitos do tipo polimorfonucleares, além da participação de alguns mediadores inflamatórios já conhecidos como prostaglandinas, histamina, bradicinina e o fator de transcrição nuclear (*NFκB*) na cavidade pleural. A segunda fase, ou fase tardia ocorre 48 h após a administração do agente flogístico (Cg, 1%/cav.). Nesta fase, ocorre um aumento maior da exsudação e de leucócitos do tipo mononuclear em relação primeira fase. Além disso, ocorre a participação de mediadores como  $LTD_4$ , PAF e ativação do *NFκB*.



**Figura 7** – Perfil temporal dos leucócitos totais e exsudação, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%/cav.), em camundongos. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*\*  $P < 0,01$ ) em relação ao grupo de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9 %) (C). Retirado: SALEH; CALIXTO; MEDEIROS 1996.

De um modo geral, a inflamação produzida na cavidade pleural é lenta e prolongada em comparação com aquela desenvolvida na pele. Isto se deve ao fato de haver diferenças na resposta ao mediador inflamatório, na drenagem linfática bem como nos tipos celulares envolvidos. Por exemplo: 5-hidroxitriptamina, BK e PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>, quando administradas isoladamente ou em combinação na cavidade pleural produzem pouca exsudação. Ao contrário, na pele, estes mediadores induzem rapidamente a formação de edema (VINEGAR et al., 1976). Além disso, a cavidade pleural ocupa uma superfície relativamente grande. Admite-se que o sítio primário da inflamação na cavidade pleural seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório, induzido experimentalmente na cavidade, pode ocorrer acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudato. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório (DOHERTY; ROBINSON, 1976; GLATT; DIEPPE; WILLOUGHBY, 1979). Além disso, o tipo, a intensidade e a duração da inflamação produzida pela injeção de um agente flogístico dependerá da sua persistência na cavidade pleural e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares. A correlação que se faz entre o modelo da pleurisia induzida pela Cg em camundongos e a asma brônquica em humanos é justamente a presença desta resposta inflamatória bifásica. Na asma humana ocorre primeiramente uma broncoconstrição logo após o estímulo e uma segunda fase inflamatória (HANG; DALE; RITTER, 2001).

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima sobre a sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória e teste de fármacos com potenciais



antiinflamatórios. Como citado, o volume de fluido extravasado, o acúmulo de células e os mediadores químicos que participam da reação podem ser quantitativa e qualitativamente analisados.

## 2 JUSTIFICATIVA

A asma brônquica é uma doença inflamatória das vias aéreas, que determina uma obstrução significativa do fluxo aéreo. Apesar do melhor conhecimento da fisiopatologia da asma e do aumento no número de medicamentos disponíveis, a incidência, a morbidade e a mortalidade têm aumentado no curso das últimas décadas. A taxa de morbidade e mortalidade por asma tem aumentado significativamente em várias partes do mundo como, por exemplo, nos Estados Unidos. Além disso, o impacto sócio-econômico da asma é muito importante, pois os custos com essa doença vêm aumentando a cada ano. Segundo estudos realizados por American Lung Association Epidemiology & Statistics Unit Research and Scientific Affairs (2003) demonstraram que a prevalência de Asma brônquica no ano de 2001 nos Estados Unidos foi de 31.3 milhões de americanos. Nos anos de 1997 à 1999 o índice de prevalência aumentou de 6 para 25%, principalmente em crianças na faixa etária de 5 a 17 anos de idade. Além disso, em 2001 foi estimado também que 12 milhões de americanos apresentaram ataques de asma, sendo que destes, 4 milhões eram crianças. Outro fator importante que deve ser mencionado é que o número de óbitos nos Estados Unidos também vem aumentando em decorrência da asma fatal (American Lung Association Epidemiology & Statistics Unit Research and Scientific Affairs, 2003). Em 2000, observou-se nos Estados Unidos, uma prevalência de morte causada por asma na ordem de 4,487/100.000 (National Center for Healthy Statistics – 1979-2000).

Para o ano de 2002 as estimativas do governo com os gastos diretos com a asma foram na ordem de US\$ 14,0 bilhões (American Lung Association Epidemiology & Statistics Unit Research and Scientific Affairs, 2003).

Na asma brônquica ocorre resposta inflamatória exacerbada expressa por tosse, sibilos, rigidez torácica e dificuldade respiratória, geralmente de caráter reversível, podendo apresentar diferentes graus de severidade e algumas vezes ser fatal. Além disso, ocorre o envolvimento de vários tipos celulares, incluindo mastócitos e eosinófilos que quando ativados, promovem aumento da reatividade das vias aéreas. Este processo inflamatório ocorre mesmo nos casos considerados leves da doença. No entanto, apesar de todos os progressos, a asma ainda hoje é uma doença de evolução problemática e que pode levar mesmo à morte. A estratégia farmacológica utilizada para o tratamento da asma apresenta dois objetivos: 1) atenuação da inflamação das vias aéreas e 2) promoção da broncodilatação. Desta forma, o reconhecimento formal do processo inflamatório como peça chave na fisiopatogenia desta doença reforçou nos últimos anos o uso de antiinflamatórios como forma mais adequada de terapia dos casos classificados como moderados e severos. Paralelamente, a indústria farmacêutica foi estimulada a procurar novos medicamentos para o tratamento desta doença.

Esforços são feitos na tentativa de melhor estudar a asma brônquica, tendo em vista que não existem modelos adequados que reproduzam esta doença em animais de laboratório. Do ponto de vista experimental, a manifestação destas diferentes fases do processo inflamatório pode ser estudada em animais de laboratório através da medida da resistência das vias aéreas ou do influxo de células inflamatórias para a luz brônquica pela técnica do lavado brônquico após exposição inalatória a diferentes compostos ou antígenos.

Com base nos conhecimentos acima, recentes trabalhos têm trazido novos conceitos a respeito do desencadeamento do processo inflamatório nas vias aéreas. Acredita-se que, certamente, a participação de citocinas, infecções virais e

diversos mediadores inflamatórios tem um papel importante na modulação da inflamação aguda e crônica deste local (WONG; FISH, 2003).

Em decorrência destes estudos, são demonstrados que a obstrução persistente das vias aéreas está intimamente associada à manutenção da inflamação (BARNES; CHUNG; PAGE, 1998), o que resultou em mudanças drásticas na terapia desta doença nos últimos tempos.

O tratamento da asma depende de fármacos glicocorticóides que são comprovadamente eficazes em controlar a asma na maioria dos pacientes tratados. Porém, o uso contínuo e prolongado deste fármaco promove muitos efeitos colaterais. Desta forma, é necessário ressaltar que o estudo de novos medicamentos com potencial antiinflamatório é importante para que ocorra uma terapia eficaz e com menor efeito colateral.

Na busca de novos medicamentos antiinflamatórios, estudos são realizados na tentativa de avaliar o efeito antiinflamatório dos ligantes RBP (PK11195 e Ro5-4864) em modelos de inflamação (TORRES et al., 1999, 2000), contribuindo assim, para o tratamento de doenças inflamatórias principalmente das vias aéreas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antiinflamatórios dos ligantes do receptor benzodiazepínico periférico (PK11195 e Ro5-4864) nas duas fases (4 e 48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar os efeitos antiinflamatórios dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) administrados via intraperitoneal (i.p.) sobre a migração dos leucócitos no sangue, no lavado pleural e em tecidos e a exsudação na cavidade pleural e em tecidos de animais com pleurisia;
- Avaliar o efeito destes fármacos, sobre as concentrações de mieloperoxidase, adenosina-deaminase e nitrito/nitrato ( $\text{NO}^x$ ), na cavidade pleural de animais com pleurisia;
- Avaliar a participação dos esteróides sobre o efeito antiinflamatório do PK11195 e Ro5-4864 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos Suíços, 1 mês de idade de ambos os sexos, pesando entre 18-22g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais mencionados foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, receberam a devida alimentação, bem como água disponível durante todo o experimento e condicionados em gaiolas de plástico sob temperatura ambiente (média de 25 °C).

### 4.2 MODELO DE INFLAMAÇÃO UTILIZADO

#### 4.2.1 Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

Os experimentos foram realizados de acordo com a técnica descrita por SPECTOR (1956), adaptada em camundongos por HENRIQUES (1990) e reproduzida por SALEH; CALIXTO; MEDEIROS (1996).

Para indução da pleurisia, os animais foram anestesiados com éter etílico, com posterior administração de 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou da carragenina (Cg, 1%) (diluído em salina 0,9%), na cavidade pleural direita através do espaço intercostal.

Após a administração do agente flogístico (Cg) ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo com uma overdose de éter etílico. Logo após, foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30 a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, os pulmões e ambas as cavidades pleurais foram expostos, sendo então, a cavidade pleural lavada com 1 mL de solução salina tamponada-

heparinizada (PBS, pH 7,4 e heparina, 20 UI/mL). As alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipetas automáticas para a quantificação dos números total e diferencial de células. Uma hora antes dos experimentos, grupos de animais foram tratados com solução de azul de Evans (25 mg/Kg, 0,2 mL/ animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001, 2002). Utilizando o mesmo protocolo experimental, as possíveis variações sobre os índices de permeabilidade vascular, no pulmão, no coração, no baço, no fígado e nos rins também foram estudados.

### **4.3 TÉCNICAS UTILIZADAS**

#### **4.3.1 Contagem total e diferencial celular na cavidade pleural e no sangue de camundongos com pleurisia.**

Após o sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (500 µL) foram reservadas para a contagem total celular, utilizando-se câmara de Neubauer. Para a realização de esfregaços celulares foi utilizada uma citocentrífuga (Wescor, Logan, Utah, EUA) e estes foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Em alguns experimentos, os animais foram anestesiados com éter etílico e as amostras de sangue total foram coletadas através da punção cardíaca em tubos de plástico contendo anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético: EDTA). A contagem total celular e a realização dos esfregaços para a contagem diferencial celular foram realizadas segundo protocolo descrito acima e trabalhos publicados por FRODE;

CALIXTO; MEDEIROS, 1996; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001; DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002. Os resultados foram expressos em número total de células ( $\times 10^6$ ).

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

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

As lâminas contendo o sedimento do lavado pleural foram centrifugadas utilizando-se citocentrífuga (Wescor, Logan, Utah, EUA) e colocadas em posição horizontal, em suporte de coloração apropriado. Após a secagem destas lâminas, 1 mL do corante May-Grünwald foi adicionado e deixado em contato durante 3 min. A seguir adicionou-se água destilada ( $\pm 20$  gotas) para cada lâmina, com auxílio de pipeta com capacidade de 1 mL. Após 1 min de incubação, o corante foi retirado e adicionou-se às lâminas 1 mL do corante Giemsa (diluído 1:20, em água destilada), durante 15 min. A seguir, o corante foi escorrido e as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas à temperatura ambiente.

#### **4.3.2 Determinação do exsudato na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.**

Nos animais submetidos à pleurisia induzida pela carragenina, após a lavagem das cavidades pleurais com solução PBS-pH 7,4 heparinizada (20 UI/L), foi utilizada uma alíquota de 200  $\mu$ L do lavado a fim de quantificar as concentrações de azul de Evans. Os experimentos foram realizados com amostras de um mesmo protocolo experimental com as concentrações do corante sendo determinadas em



leitor de Elisa (Organon-Teknica, Microwell System, Roseland, New Jersey, EUA) por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,1-50  $\mu\text{g/mL}$ ) também tiveram suas densidades óticas determinadas, com auxílio da equação da reta (FRODE; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001; DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002). Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.3.3 Determinação da permeabilidade vascular em tecidos de camundongos com pleurisia.**

A permeabilidade vascular foi avaliada em diferentes órgãos, sendo inicialmente determinados seus respectivos pesos (pulmão, coração, baço, fígado e rim) em gramas. Com repetidas lavagens em solução PBS e após remoção dos tecidos adjacentes os tecidos foram cortados em fatias e transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de formamida (P.A.). As amostras foram incubadas em banho-maria (45°C) durante 72 h para posterior quantificação dos níveis de azul de Evans. Decorrido o período de incubação, os tubos de ensaio foram centrifugados (10 min, 50 x g) e os sobrenadantes foram transferidos para cubetas para medida das concentrações do azul de Evans, que foram realizadas segundo a metodologia descrita no modelo da pleurisia (item 4.3.2.). Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  de tecido úmido.

#### **4.3.4 Determinação da mieloperoxidase nas amostras colhidas do lavado pleural de camundongos com pleurisia.**

Neste grupo de experimentos, não foi utilizado o corante azul de Evans. Após a morte dos animais, amostras do lavado pleural de camundongos tratados previamente com solução PBS estéril, carragenina (1%) ou ligantes PBR (PK11195 e Ro5-4864) foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação das concentrações de mieloperoxidase. Volumes de 40  $\mu$ L do lavado ou do padrão mieloperoxidase de neutrófilos humanos (Sigma M-6908: 0,7-140 mU/mL) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360  $\mu$ L de meio tampão (0,167 mg/mL de *o*-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RAO et al, 1993). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30  $\mu$ L de azida sódica (1%). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50 x g, 5 min) e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em Leitor de Elisa (Organon-Teknica, Microwell System, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta (FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001).

#### **4.3.5 Determinação da adenosina-deaminase nas amostras colhidas do lavado pleural de camundongos com pleurisia.**

Inicialmente amostras com concentração conhecida (volume final 500  $\mu$ L) de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (35 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (15 mM) e NH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> (15 mM) foram preparadas com a finalidade de obtermos curva padrão com concentração

conhecida (10 a 50 U/L) de adenosina. Amostras do fluido pleural (20  $\mu$ L) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6,5, 500  $\mu$ L, composição:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e adenosina (0.5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000  $\mu$ L) de fenol (1 mM), nitroprussiato (0,17 mM) e tampão fosfato (1000  $\mu$ L: NaOCl: 11 mM). Esta solução também foi adicionada as cubetas contendo concentrações diferentes das amostras padrão (2000  $\mu$ L). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de Elisa (Organon-Teknica, Microwell System, Roseland, New Jersey, EUA) (FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001). As quantificações dos valores desconhecidos foram expressas em U/L, com auxílio da equação da reta.

#### **4.3.6 Análise quantitativa do Nitrito/Nitrato ( $\text{ON}^x$ ) nas amostras colhidas do lavado pleural de camundongos com pleurisia.**

O óxido nítrico foi quantificado pela formação dos metabólitos nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982; DI ROSA et al., 1996). Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. As amostras do lavado da cavidade pleural de camundongos tratados com solução salina, carragenina e/ou com diferentes fármacos (PK11195 ou Ro5-4864) foram coletadas, armazenadas em frascos Eppendorf e estocadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ . No dia dos experimentos, as amostras do lavado pleural foram descongeladas em temperatura ambiente e foram desproteinizadas adicionando-lhes hidróxido de sódio (6 mM) e sulfato de zinco (0,6%). A seguir, 250  $\mu$ L do lavado da cavidade pleural foi diluído em uma solução contendo formato de amônio (30  $\mu$ L), fosfato de hidrogênio dissódico

dodecahidratado (30  $\mu\text{L}$ ) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922 (30  $\mu\text{L}$ ): diluída (1:10) em tampão PBS-pH 7,4. A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C, e a seguir, centrifugada (50 x g, 5 min). Cerca de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde o mesmo volume de solução de Griess: fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (5% (vol/vol), ácido sulfanílico (1%) e N-(1-naftil) etilenodiamino) (0,1%) foi adicionado e incubado durante 10 min, à temperatura ambiente (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999).

A reação de  $\text{NO}_2^-$  com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em leitor Elisa (Organon-Teknica, Microwell System, Roseland, New Jersey, EUA) em 545 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  (0-150  $\mu\text{M}$ ) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato, em  $\mu\text{M}$ , com auxílio da equação da reta.

#### **4.3.7 Análise histológica de amostras de pulmão, baço e fígado de camundongos com pleurisia.**

Os camundongos receberam 0,1 mL de carragenina (1%) ou veículo (salina estéril, 0,9%), via intrapleural, sendo sacrificados com overdose de éter etílico 4 e 48 h após a pleurisia. Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta, sendo primeiramente retirados o baço e o fígado. A seguir os animais foram traqueostomizados e inserida uma cânula que foi amarrada com fio de sutura junto à traquéia. A seguir, os pulmões foram ocluídos com 0,3 mL de formalina até o processamento histológico. As amostras (pulmão, baço e fígado) foram conservadas em frascos contendo formalina a 10% por 48 h. Após 48 h, os segmentos teciduais foram colocados em cápsulas de plástico inseridas em cesta de metal do aparelho

histotécnico (Leica, Nussloch, Alemanha). No aparelho, os segmentos teciduais foram sucessivamente desidratados em etanol (70° GL, 80° GL e 95° GL e absoluto, respectivamente), durante 1 h em cada etapa. Em seguida, estes foram incubados consecutivamente em solução de xilol P.A. para posterior solidificação em parafina. As cápsulas contendo os segmentos desidratados e parafinados foram então retiradas do aparelho histotécnico e cada fragmento foram envoltos num quadrado metálico de (Leockart) e imediatamente embebido novamente em parafina líquida. Os quadrados foram então armazenados em geladeira para a completa solidificação. Os fragmentos teciduais foram cortados à espessura de 3 micras, com auxílio do micrótomo (Leica, Nussloch, Alemanha). Posteriormente, procedeu-se a desparafinação em banho-maria, e o material foi então transferido para uma lâmina de vidro. A seguir, estas lâminas foram secas em estufa à 50°C, durante 24 h e armazenadas à temperatura ambiente, para posterior coloração pela hematoxilina-eosina. Os parâmetros histopatológicos avaliados foram: organização tecidual, morfologia celular, edema e apoptose celular. Para as quantificações dos parâmetros histopatológicos analisados foram atribuídos graus de 0 a 3 (0 – ausente [até 4 células por campo]; 1 – discreto [de 5 à 15 células por campo]; 2 – moderado [de 16 à 25 células por campo] e 3 – abundante [acima de 26 células por campo]), de acordo com as escalas propostas por MOTOHIRO et al., 1986 e LOSSOS et al., 2000. A avaliação histopatológica foi realizada por estudo duplo-cego. A análise estatística entre os grupos foi realizada pelo método não-paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças significativas foram consideradas se  $P < 0,05$ .

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

Após secagem das lâminas em estufa (50°C), procedeu-se à coloração, por hematoxilina (0,4%) (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cuba de vidro, por 3 min, seguida da lavagem em água corrente (10 min). Na próxima etapa, adicionou-se solução de água amoniacal (1 mMol) (Merck, Darmstadt, Alemanha), na cuba de vidro e logo a seguir, novo banho em água corrente por 10 min. Foi realizada posteriormente, a imersão das lâminas em eosina amarelada (0,35%) por 2 min (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), seguida de novo banho em álcool absoluto (10 banhos). Após esta etapa as lâminas foram imersas em xilol P.A., mantido em cuba de vidro. Por fim, foi realizada a fixação das lâminas com entellan e lamínula, para posterior quantificação da celularidade em microscópio ótico comum (aumento de 500x), contando-se 100 células. Os resultados foram expressos de acordo com parâmetros histológicos propostos por MOTOHIRO et al., 1986 e LOSSOS et al., 2000.

## **4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

### **4.4.1 Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre os níveis da exsudação e da migração leucocitária no sangue e na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.**

O efeito do PK11195 e do Ro5-4864 sobre os níveis de leucócitos foi investigado no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Neste protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (1 h com PK11195 ou 0,5 h com Ro5-4864) nas doses de 0,01-1,0 mg/Kg, i.p. Os parâmetros inflamatórios (Leucócitos totais, neutrófilos, mononucleares e exudação) foram analisados 4 e 48 h após a indução da pleurisia

pela carragenina como descrito por SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001, DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002. Após o estabelecimento da dose mais eficaz dos fármacos estudados em inibir a migração leucocitária e a exudação na cavidade pleural foi avaliado o perfil temporal tanto do PK11195 como do Ro5-4864. Desta forma, os períodos de tratamento prévio escolhidos foram de 0,5 a 24 h para o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) e 0,5 a 4 h para o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.). Além disso, na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, diferentes grupos de animais foram tratados com 2 doses de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) num intervalo de 12 horas. Desta maneira, diferentes grupos de animais receberam inicialmente 1 dose de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) e após 1 h administrou-se a carragenina (1%/cav). Decorridos 12 horas da administração do fármaco, estes diferentes grupos de animais receberam mais uma dose dos respectivos fármacos (0,1 mg/Kg, i.p.). Os parâmetros inflamatórios: exsudação e migração celular foram analisados 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina.

Em todos os grupos de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril (NaCl 0.9%) na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo adotados para os grupos que receberam o tratamento com os fármacos citados acima. Quando necessário, o grupo desses animais recebeu apenas injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir os fármacos testados. Além disso, avaliou-se também o efeito dos fármacos isoladamente. Desta forma, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses do PK11195 ou Ro5-4864.

#### **4.4.2 Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos com pleurisia.**

O efeito do PK11195 e do Ro5-4864 foi avaliado sobre a permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rim) de camundongos com pleurisia. Para a realização deste experimento, foi estabelecido a melhor dose e o melhor tempo destes fármacos capaz de inibir a concentração do azul de Evans na cavidade pleural. Assim, os animais foram tratados previamente (1 h) com PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.). A análise da exudação tecidual foi avaliada 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina (1%). Paralelamente foram incluídos animais-controle que receberam a injeção (i.pl.) de solução salina estéril (NaCl, 0,9%) ou do veículo utilizado para diluir os fármacos testados. Além disso, grupo de animais tratado somente com os fármacos também foi utilizado.

De acordo com o protocolo experimental, os animais foram sacrificados com overdose de éter etílico e os pulmões, o coração, o baço, o fígado e o rim foram removidos e preparados de acordo com a técnica descrita anteriormente no item 4.3.3.

Na segunda fase (48 h) desta inflamação não foi estudada a permeabilidade vascular, uma vez que tanto o Ro5-4864 como o PK11195 não foram capazes de inibir a exsudação pleural induzida pela carragenina em camundongos.



#### **4.4.3 Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre os níveis da mieloperoxidase, da adenosina-deaminase e do Nitrito/Nitrato (ON<sup>x</sup>) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia.**

O efeito dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) sobre os níveis da mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA) e nitrito/nitrato, foi investigado no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. De acordo com o protocolo experimental na primeira (4 h) fase desta resposta inflamatória, diferentes grupos de animais foram tratados previamente com PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h) ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 0,5 e 1 h). As análises das enzimas MPO, ADA e metabólitos do óxido nítrico foram estudados 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina.

Na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, diferentes grupos de animais foram tratados com 2 doses de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) num intervalo de 12 horas. Desta maneira, os animais receberam inicialmente 1 dose de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) e após 1 h administrou-se a carragenina (1%/cav.). Decorridos 12 horas da administração dos fármacos (PK11195 ou Ro5-4864), estes animais receberam mais uma dose (0,1 mg/Kg, i.p.) dos respectivos fármacos. Os parâmetros inflamatórios: MPO, ADA e metabólitos do óxido nítrico foram analisados 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina.

Em cada grupo de experimentos foram incluídos animais-controle, que receberam a injeção de solução salina estéril na cavidade pleural. Esses animais foram sacrificados nos mesmos intervalos adotados para os grupos que receberam o tratamento prévio com os fármacos citados acima. Quando necessário, o grupo desses animais recebeu apenas a injeção intrapleural do veículo utilizado para diluir

os fármacos testados. Além disso, grupo de animais tratado somente com os fármacos também foi utilizado.

#### **4.4.4 Análise histológica de amostras de pulmão, baço e fígado de camundongos com pleurisia tratados com ligantes do RPB (PK11195 e Ro5-4864).**

O efeito dos ligantes do RPB (PK11195 e Ro5-4864) sobre os leucócitos teciduais foi investigado no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Neste protocolo experimental, para a análise histológica dos tecidos na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, os animais foram tratados previamente (1 h com PK11195 ou 0,5 h com Ro5-4864) na dose de 0,1 mg/Kg, i.p. Com relação à segunda fase (48 h), os animais foram tratados inicialmente com 1 dose de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) e após 1 h administrou-se a carragenina (1%/cav). Decorridos 12 horas da administração dos fármacos, estes animais receberam mais uma dose de PK11195 ou Ro5-4864: 0,1 mg/Kg, i.p.

Em cada grupo de experimentos foram incluídos grupos de animais que receberam a injeção de salina estéril. Além disso, diferentes grupos de animais receberam a administração somente da carragenina (1%/cav.) ou PK11195 ou Ro5-4864. Os leucócitos teciduais foram avaliados 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina, segundo o protocolo descrito no item 4.3.7.

#### **4.4.5 Efeito dos ligantes do RBP (PK11195 ou Ro5-4864) em animais com pleurisia tratados com DL-aminoglutatimida**

Neste grupo experimental, os animais foram tratados previamente (0,5 h) com 0,1 mL de DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal (i.p.). A seguir grupos diferentes de animais receberam 0,1 mL de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), que foram administrados antes da carragenina (1%, cav.) (1 h para o PK11195 e 0,5 h para o Ro5-4864). A análise dos parâmetros inflamatórios (Contagem total e diferencial de células no lavado pleural e no sangue, determinação do exsudato no lavado pleural, bem como a análise da atividade da mieloperoxidase e adenosina deaminase além dos níveis do óxido nítrico) foi estudada 4 h após. Para analisar estes mesmos parâmetros inflamatórios na segunda (48 h) fase, os animais receberam 0,1 mL de DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), 0,5 h antes da dose de PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) e após 1 h administrou-se a carragenina (1%/cav). Decorridos 12 horas da administração dos fármacos (PK11195 ou R05-4864), estes animais receberam mais uma dose dos respectivos fármacos (0,1 mg/Kg, i.p.).

Para estudar os parâmetros inflamatórios na pleurisia 4 e 48 h seguiu-se os protocolos descritos nos itens 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4 e 4.3.5.

Paralelamente diferentes grupos de animais-controle foram tratados somente com solução salina, do diluente da droga ou aminoglutatimida ou os fármacos nas doses estudadas.

#### 4.5 REAGENTES

Utilizamos os seguintes reagentes: PK11195, Ro5-4864 e DL-aminoglutatimida, *o*-dianizidina, 2HCl (3,3'-dimetioxibenzedina), mieloperoxidase de neutrófilos humanos (MPO: 20 U/mg de proteína; 1 unidade de MPO é definida como a atividade da enzima capaz de oxidar 1 mol de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por minuto à 25°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); *Escherichia coli* (E.C. ATCC 25922); carragenina lambda (grau IV), álcool etílico (70°, 80°, 95° e absoluto), álcool metílico, eosina amarela, parafina líquida e sólida, formol (Synth, Barueri, São Paulo, Brasil); solução tampão fosfato (PBS – pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM), corante giemsa, ácido etilenodiaminotetracético (Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil); fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado, sulfato de zinco, ácido cítrico, formamida, citrato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%), sulfato de amônio, ácido fosfórico 85% (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil); dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamino, nitrito, hematoxilina, água amoniacal, xilol P.A., entellan, nitroprussiato de sódio (Merck, Armstard, Alemanha); azul de Evans, formato de amônio, diaminobenzidina (DAB) (ACROS-Organics, New Jersey, EUA); éter etílico (Dinamica, São Paulo, São Paulo, Brasil); solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Sanoclear, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil); heparina (Cristalia, São Paulo, São Paulo, Brasil); corante May-Grüwald (Newprov, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil); fosfato de sódio hidratado, fenol, (Reagen, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil); azida sódica (Riedel-de-Häen, Seelze, Alemanha); adenosina (Fluka, St. Gallen, Suíça).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (exsudação, migração celular) foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.).

Diferenças estatísticas entre os parâmetros inflamatórios analisados dos fármacos estudados (migração celular, exsudação, permeabilidade vascular, adenosina-deaminase, mieloperoxidase e metabólitos do óxido nítrico) e entre grupos-controle foram determinadas utilizando-se o teste ANOVA (Dunnett) complementado, quando necessário pelo teste *t* de student. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

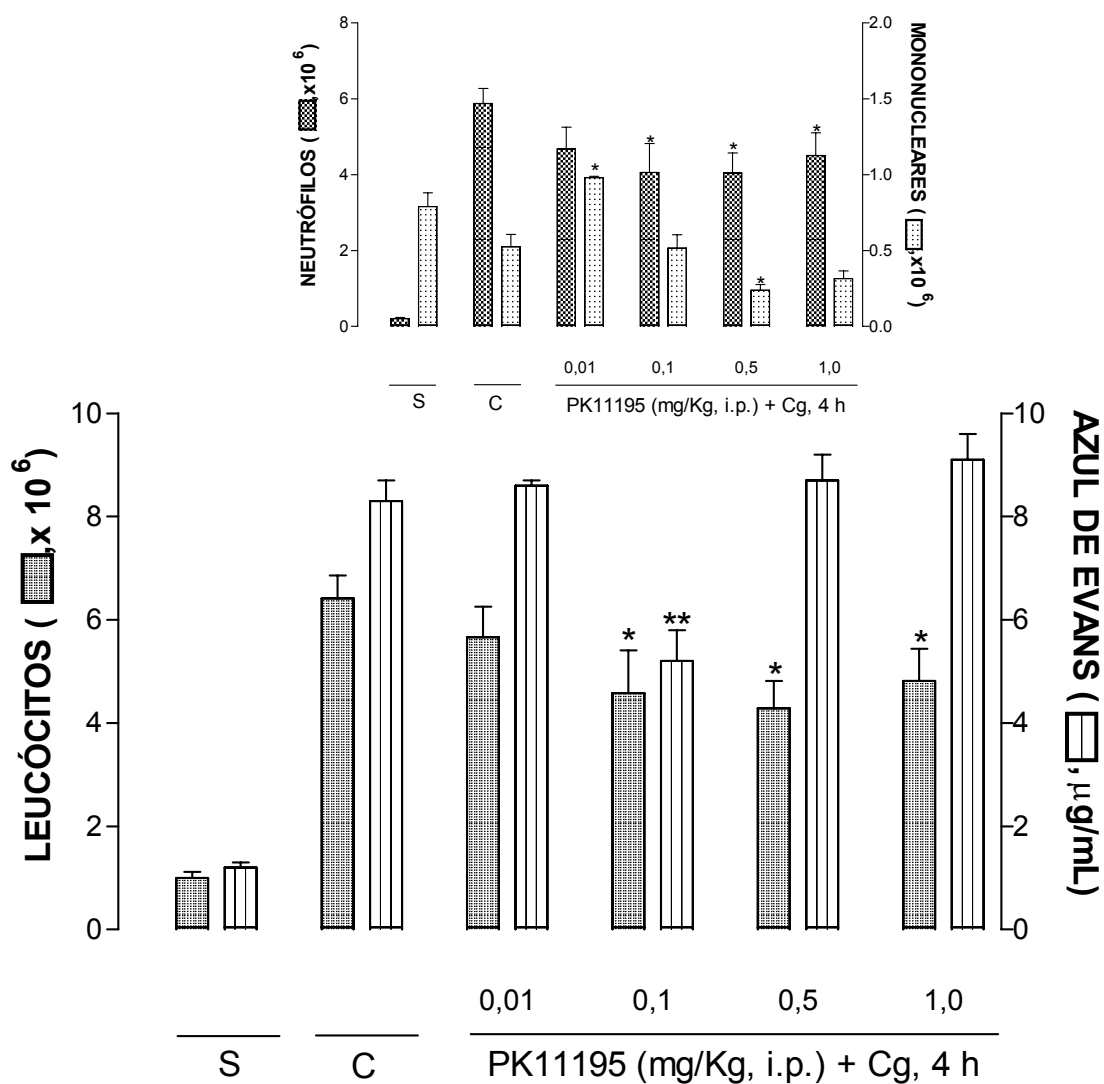
Os resultados da análise histológica foram expressos atribuindo-se graus de 0 a 3, sendo 0 – ausente [até 4 células por campo]; 1 – discreto [ de 5 à 15 células por campo]; 2 – moderado [de 16 à 25 células por campo] e 3 – abundante [acima de 26 células por campo] (MOTOHIRO et al., 1986; LOSSOS et al., 2000). Neste parâmetro de estudo utilizou-se para a análise estatística o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de  $P < 0,05$ , foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

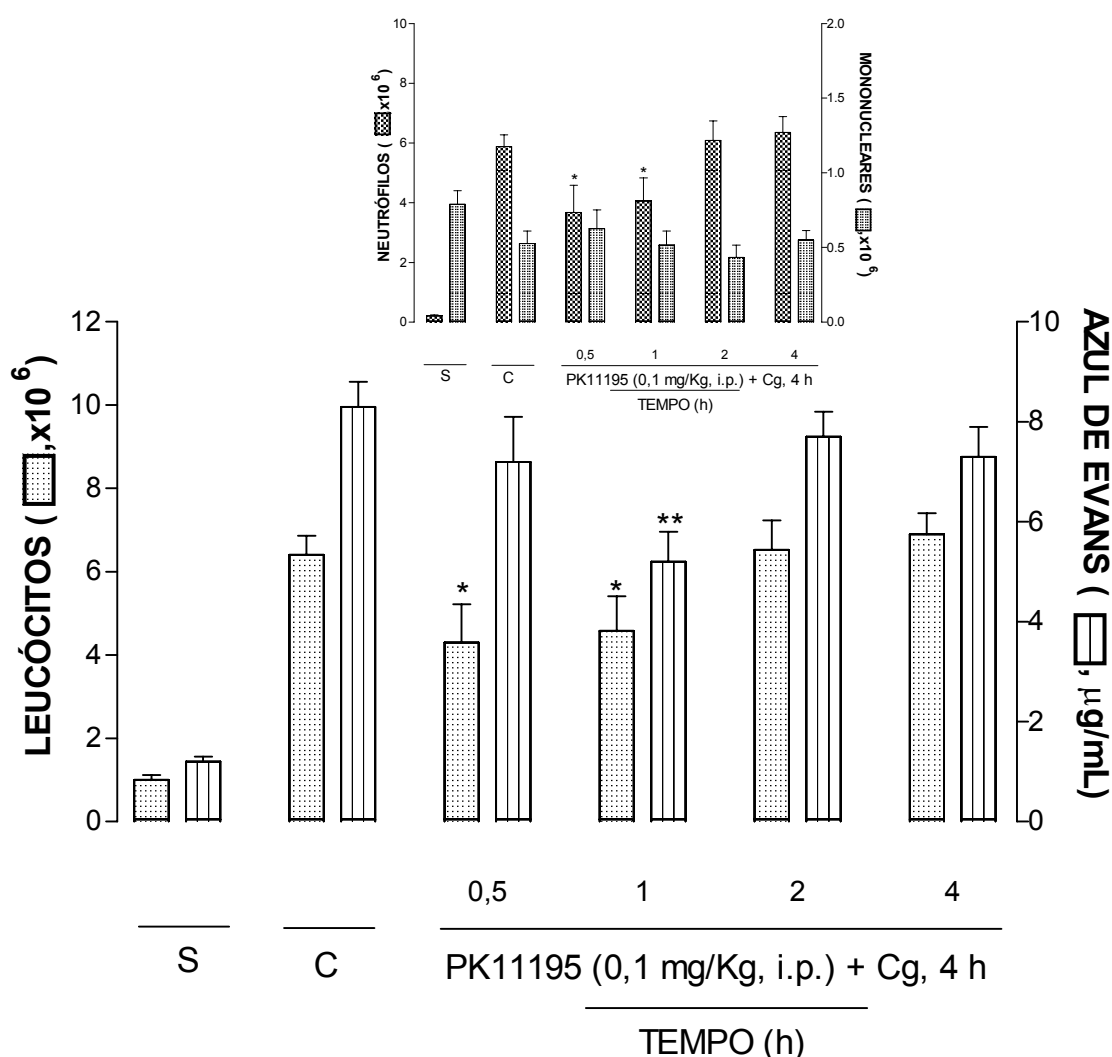
### 5.1 EFEITO DO PK11195 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS E EXSUDATO EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

A figura 8 mostra que o PK11195 administrado 1 h antes do agente flogístico foi efetivo em inibir significativamente os leucócitos nas doses de 0,1 a 1,0 mg/Kg, i.p. na pleurisia induzida pela carragenina 4 h ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,4$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $4,6 \pm 0,8$ ; 0,5 mg/Kg, i.p.:  $4,3 \pm 0,5$  e 1,0 mg/Kg, i.p.:  $4,8 \pm 0,6$ ) ( $P < 0,05$ ) às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $4,0 \pm 0,7$ ; 0,5 mg/Kg, i.p.:  $4,0 \pm 0,5$  e 1,0 mg/Kg, i.p.:  $4,5 \pm 0,6$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 8, *inset*). O PK11195 administrado 1 h antes da Cg nas doses de 0,01 mg/Kg, i.p. ou 0,5 mg/Kg, i.p. aumentou ou diminuiu significativamente os mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $0,5 \pm 0,1$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $0,9 \pm 0,1$  e 0,5 mg/Kg, i.p.:  $0,2 \pm 0,1$ ), respectivamente ( $P < 0,05$ ) (Figura 8, *inset*). Com relação à exsudação, o PK11195 (na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes), foi também efetivo em inibir este parâmetro inflamatório ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $8,3 \pm 0,5$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $5,2 \pm 0,6$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 8).

Ao avaliar o perfil temporal deste fármaco, observamos que o PK11195 quando administrado também 0,5 h antes da carragenina inibiu significativamente a migração celular ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,4$ ; 0,5 h:  $4,3 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 9), às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; 0,5 h:  $3,6 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 9, *inset*).



**Figura 8** – Efeito do PK11195, sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses do PK11195 (0,01-1,0 mg/Kg, i.p.) administradas 1 h antes da carragenina. S = resposta obtida de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.



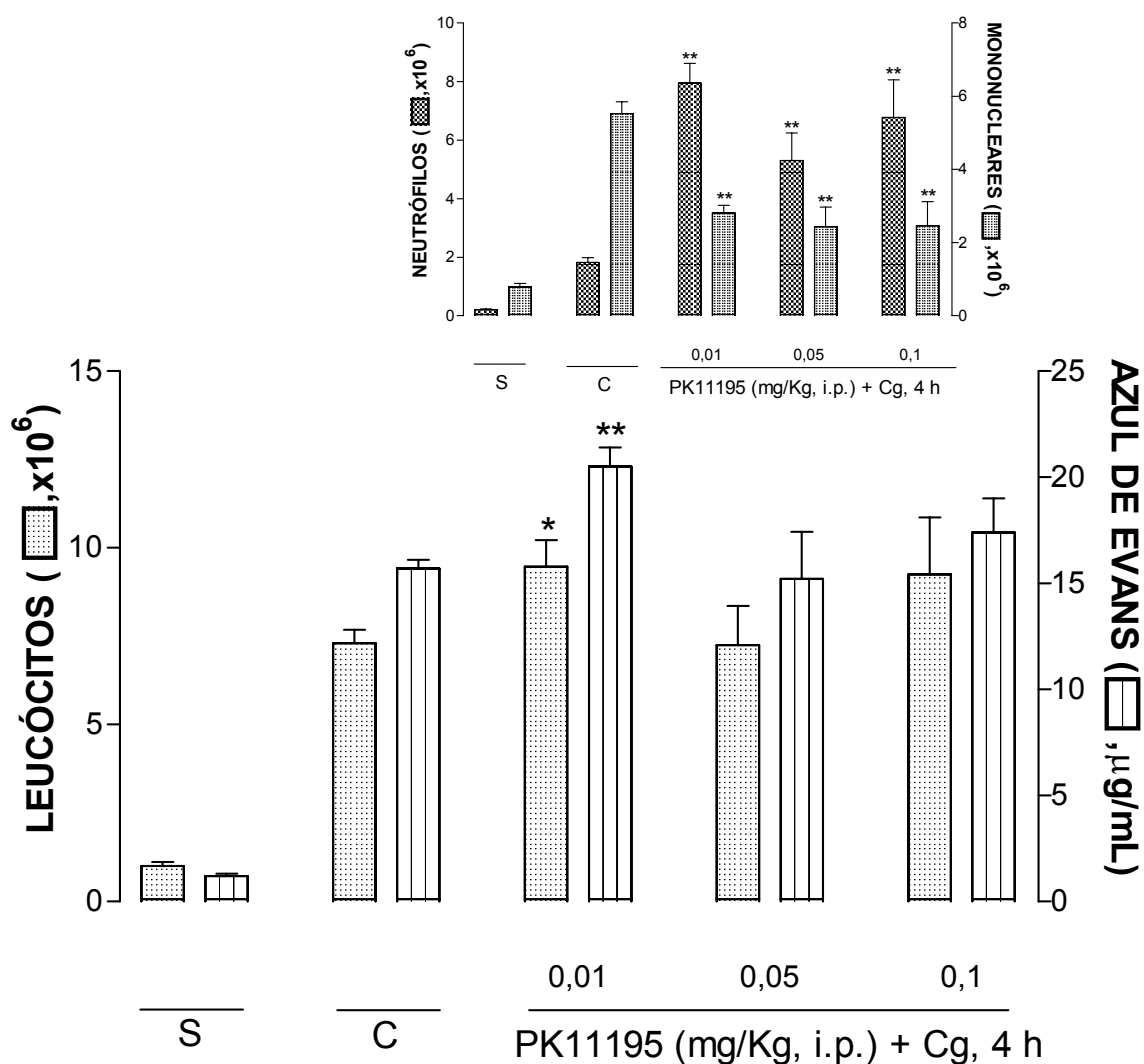
**Figura 9** – Avaliação do perfil temporal do PK11195, sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado de 0,5 a 4 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

Em relação à segunda fase (48 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural, o PK11195 na dose de 0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p., administrado 1 h antes da carragenina inibiu de forma significativa o influxo de mononucleares (x10<sup>6</sup>) (S: 0,8±0,1; Cg 48 h: 5,5±0,3; 0,01 mg/Kg, i.p.: 2,8±0,2; 0,05 mg/Kg, i.p.: 2,4±0,5 e 0,1 mg/Kg, i.p.: 2,5±0,6) (P < 0,01) (Figura 10, *inset*). Por outro

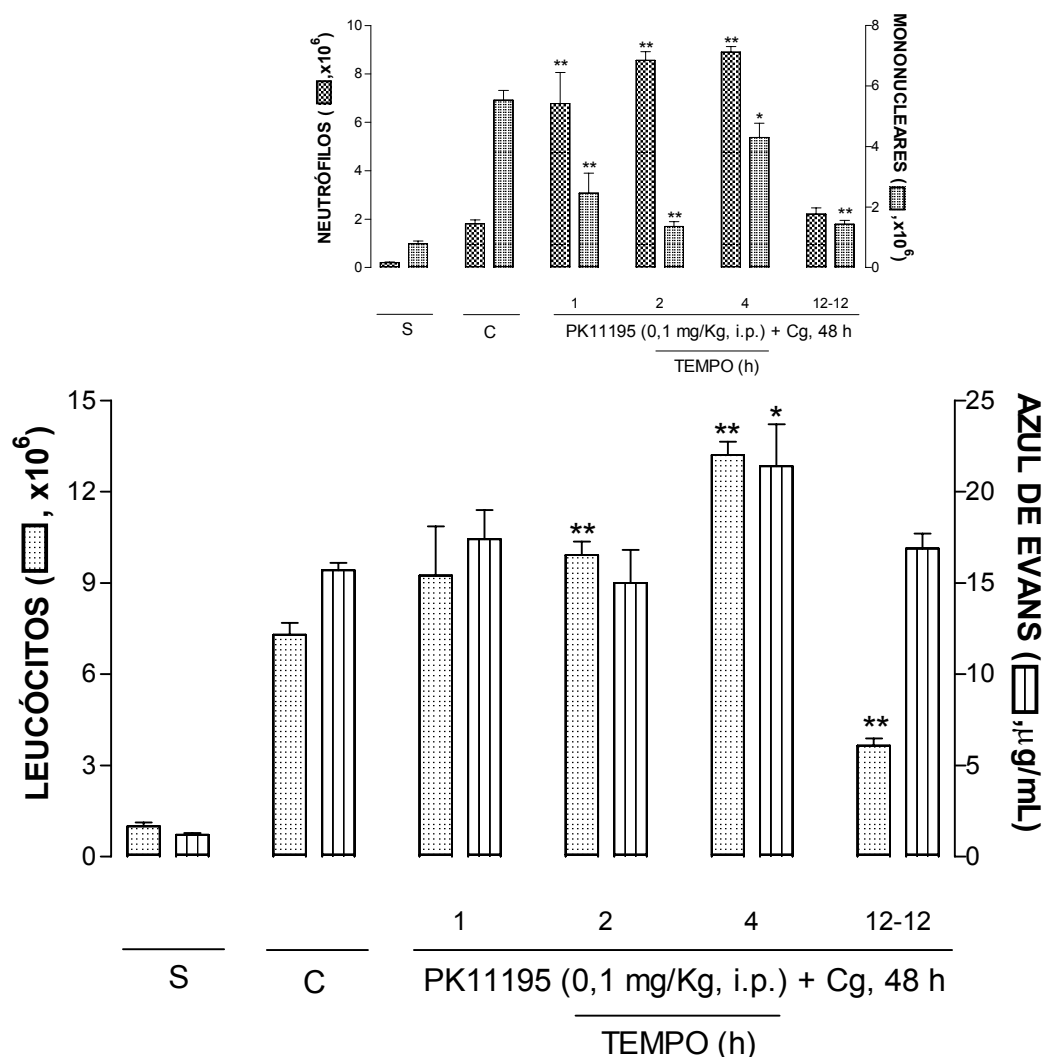


lado, o PK11195 (0,01 mg/Kg, i.p.) aumentou significativamente tanto os leucócitos totais ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $7,3 \pm 0,4$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $9,4 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,05$ ) como a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $15,7 \pm 0,4$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $20,5 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 10). Além disso, nas doses de 0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p., 1 h da Cg, este fármaco aumentou também o número de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $1,8 \pm 0,1$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $7,9 \pm 0,7$ ; 0,05 mg/Kg, i.p.:  $5,3 \pm 0,9$  e 0,1 mg/Kg, i.p.:  $6,7 \pm 1,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10, *inset*).

A avaliação do perfil temporal mostra que este fármaco na dose de 0,1 mg/Kg, i.p. promoveu uma diminuição significativa dos leucócitos totais quando administrado somente em duas doses de 0,1 mg/Kg, i.p. num intervalo de 12 horas ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $7,3 \pm 0,4$ ; PK11195:  $3,6 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,01$ ) (figura 11). Esta inibição foi às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $5,5 \pm 0,3$ ; PK11195:  $1,4 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11, *inset*). O PK11195 também demonstrou ser eficaz em inibir a migração de mononucleares quando administrado de 1 a 4 h antes da Cg ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $5,5 \pm 0,3$ ; 1 h:  $2,4 \pm 0,6$ ; 2 h:  $1,4 \pm 0,1$  e 4 h:  $4,3 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11, *inset*). Neste mesmo protocolo experimental observa-se também um aumento significativo dos leucócitos no período de 2 e 4 h de tratamento prévio de animais com o fármaco estudado ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $7,3 \pm 0,4$ ; 2 h:  $9,9 \pm 0,4$ ; 4 h:  $13,2 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11), bem como um aumento na migração de neutrófilos nos períodos entre 1 e 4 h antes da Cg ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $1,8 \pm 0,1$ ; 1 h:  $6,8 \pm 1,2$ ; 2 h:  $8,5 \pm 0,3$ ; 4 h:  $8,9 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,01$ ). Em relação à exsudação observou-se um aumento significativo quando da administração do PK11195 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p. 4 h antes do agente flogístico ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $15,7 \pm 0,4$ ; 4 h:  $21,4 \pm 2,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figuras 11).



**Figura 10** - Efeito do PK11195, sobre a migração celular e a exsudação na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses do PK11195 (0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p.) administradas 1 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.



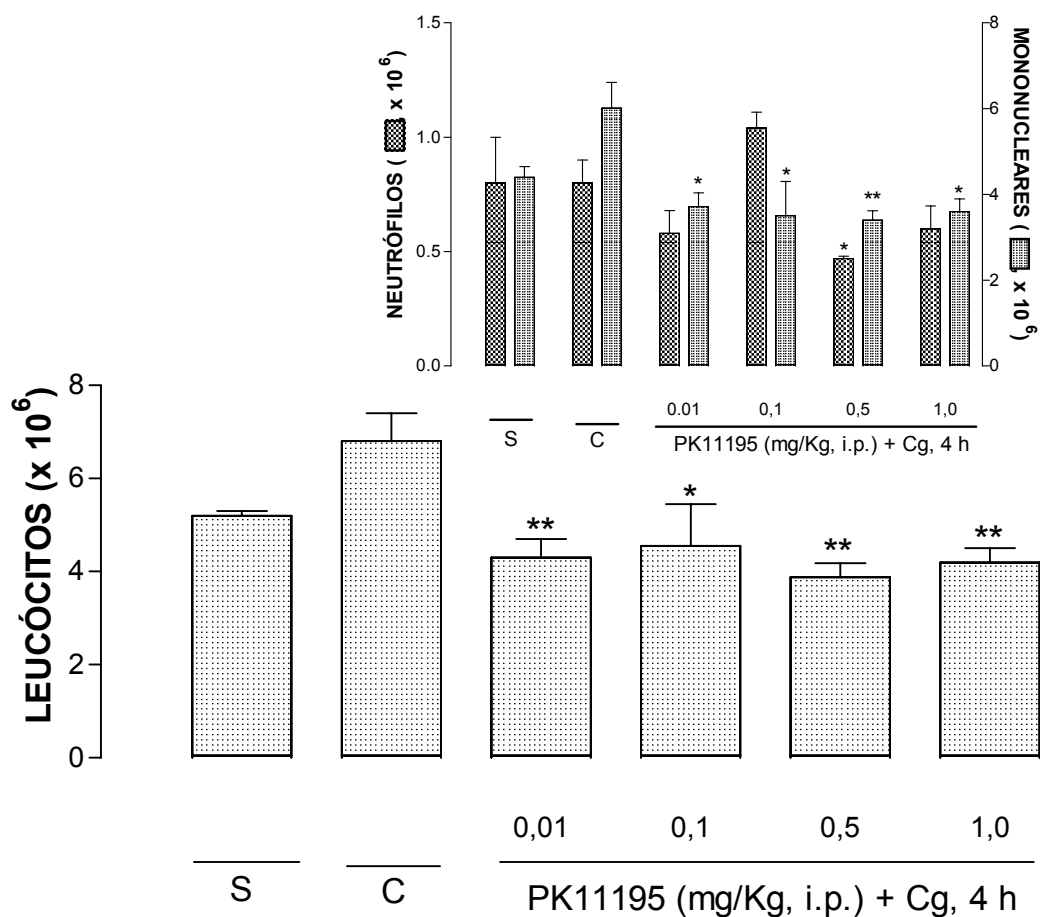
**Figura 11** - Avaliação do perfil temporal do PK11195, sobre a migração celular e a exsudação na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado de 1 a 4 h ou em duas doses num intervalo de 12 horas. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

## 5.2 EFEITO DO PK11195 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS NO SANGUE DE CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

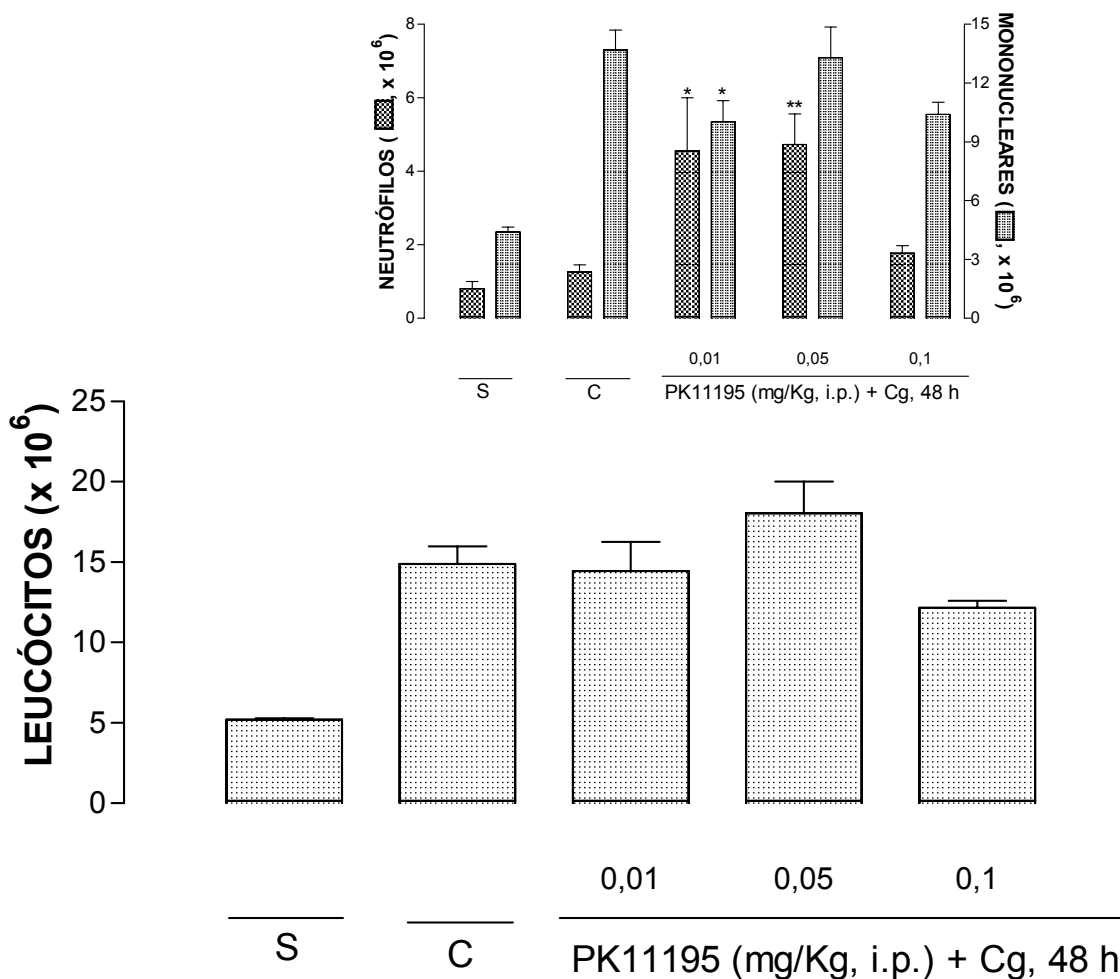
Analizamos neste protocolo o efeito sistêmico do PK11195. Observou-se que este fármaco nas doses de 0,01 a 1,0 mg/Kg, i.p., administrados 1 h antes da carragenina foi capaz de diminuir significativamente os leucócitos totais (x10<sup>6</sup>) (S: 5,2±0,1; Cg 4 h: 6,8±0,6; 0,01 mg/Kg, i.p.: 4,3±0,4; 0,1 mg/Kg, i.p.: 4,5±0,9; 0,5

mg/Kg, i.p.:  $3,9 \pm 0,3$  e  $1,0$  mg/Kg, i.p.:  $4,2 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 12), às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 4 h:  $6,0 \pm 0,5$ ;  $0,01$  mg/Kg, i.p.:  $3,7 \pm 0,3$ ;  $0,1$  mg/Kg, i.p.:  $3,5 \pm 0,8$ ,  $0,5$  mg/Kg, i.p.:  $3,4 \pm 0,2$  e  $1,0$  mg/Kg, i.p.:  $3,6 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 12, *inset*) em relação aos animais tratados com Cg. Ressaltamos que nesta mesma figura o PK11195 na dose de  $0,5$  mg/Kg, i.p. também promoveu uma inibição significativa de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,2$ ; Cg 4 h:  $0,8 \pm 0,1$ ;  $0,5$  mg/Kg, i.p.:  $0,4 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 12, *inset*).

Na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, o PK11195 ( $0,01$  mg/Kg, i.p.) inibiu significativamente somente o número de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 48h:  $14,9 \pm 1,0$ ;  $0,01$  mg/Kg, i.p.:  $10,1 \pm 1,0$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 13, *inset*). Com relação aos leucócitos totais, o PK11195 não demonstrou alteração significativa, porém, este fármaco promoveu um aumento do influxo de neutrófilos quando administrado 1 h antes da Cg nas doses de  $0,01$  e  $0,05$  mg/Kg, i.p. ( $\times 10^6$ ) ( $0,8 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $1,2 \pm 0,2$ ;  $0,01$  mg/Kg, i.p.:  $4,5 \pm 1,4$  e  $0,05$  mg/Kg, i.p.:  $4,7 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 13, *inset*).



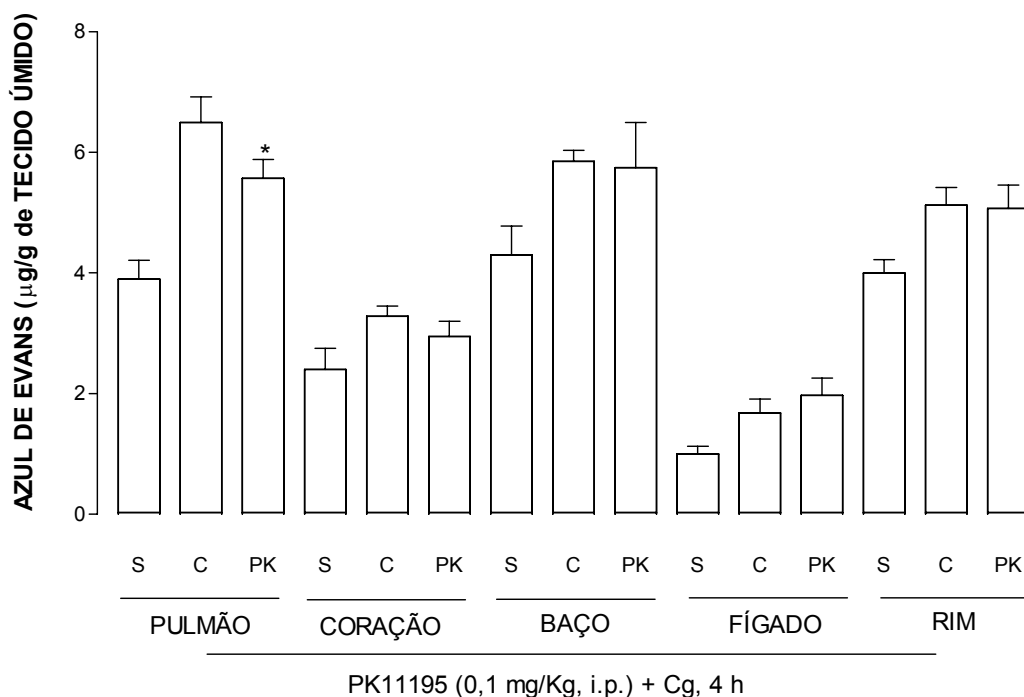
**Figura 12** – Efeito de diferentes doses do PK11195, sobre os níveis de leucócitos no sangue na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses de PK11195 (0,01-1,0 mg/Kg, i.p.) administradas 1 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.



**Figura 13** - Efeito do PK11195, sobre os níveis de leucócitos no sangue na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses de PK11195 (0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p.) administradas 1 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

### 5.3 EFEITO DO PK11195 SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

A permeabilidade vascular em tecidos foi analisada neste protocolo experimental. A administração do PK11195 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes do agente flogístico, inibiu de forma significativa os níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/g}$  de Tecido úmido) apenas no pulmão (S:  $3,9 \pm 0,3$ ; Cg 4 h:  $6,5 \pm 0,4$ ; PK11195:  $5,5 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 14).

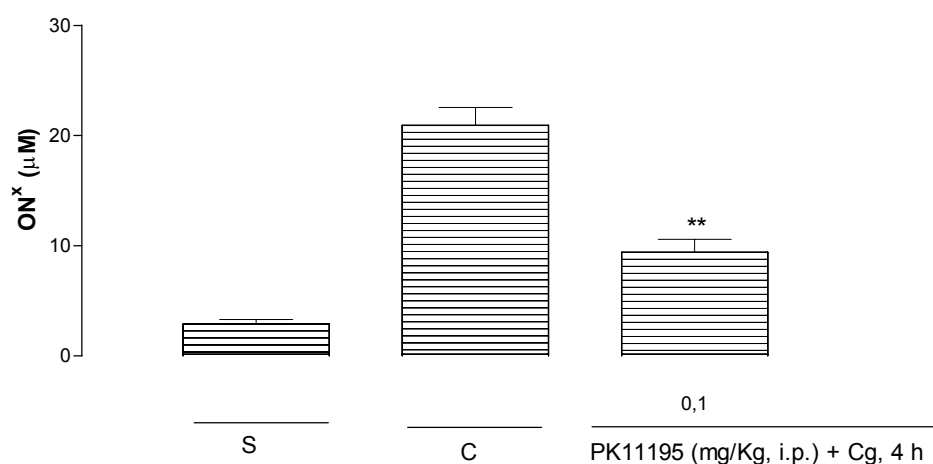


**Figura 14** - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p. 1 h antes da carragenina) sobre a permeabilidade vascular tecidual (pulmão, coração, baço, fígado e rim) na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%). Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05) em relação aos respectivos controles.

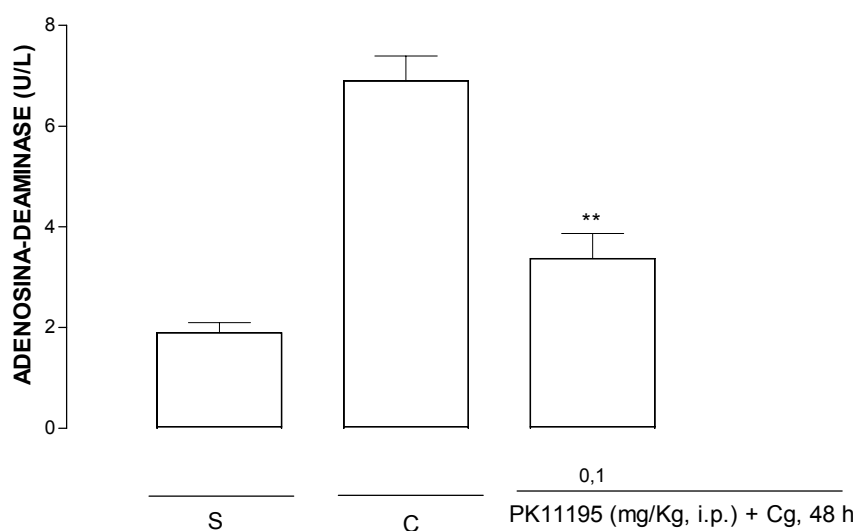
#### 5.4 EFEITO DO PK11195 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA MIELOPEROXIDASE, DA ADENOSINA-DEAMINASE E DE NITRITO/NITRATO (ON<sup>x</sup>), EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

O PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 1 h antes da Cg, inibiu significativamente somente os níveis de nitrito/nitrato (ON<sup>x</sup>) (µM) (S: 2,9±0,4; C: 20,9±1,6; PK11195: 9,4±1,1) (P < 0,01) (Figura 15), na primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória.

Na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela Cg, o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses (0,1 mg/Kg, i.p.) num intervalo de 12 horas, foi eficaz somente na inibição das concentrações da adenosina-deaminase (U/L) (S: 1,9±0,2; C: 6,9±0,4; PK11195: 3,3±0,6) (P < 0,01) (Figura 16).



**Figura 15** - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p. 1 h antes da carragenina) sobre os níveis de nitrato/nitrito (ON<sup>x</sup>) na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%). Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.



**Figura 16** - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas sobre os níveis de adenosina-deaminase na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

## 5.5 EFEITO DO PK11195 SOBRE OS LEUCÓCITOS TECIDUAIS (PULMÃO, BAÇO E FÍGADO) EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

O infiltrado celular em tecidos foi analisado observando-se a organização e a alteração morfológica celular. A Figura enumerada (A) representa a análise



histológica dos tecidos de camundongos tratados somente com solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e a Figura B, animais tratados com Cg (1%/cav.).

Com relação ao pulmão, na primeira fase (4 h) da pleurisia, o PK11195 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., administrado 1 h antes da carragenina, diminuiu de forma significativa o edema pulmonar (grau 3 para 1) e o número de neutrófilos e de mononucleares (grau 3 para 1) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17 C), quando comparamos com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 17 B).

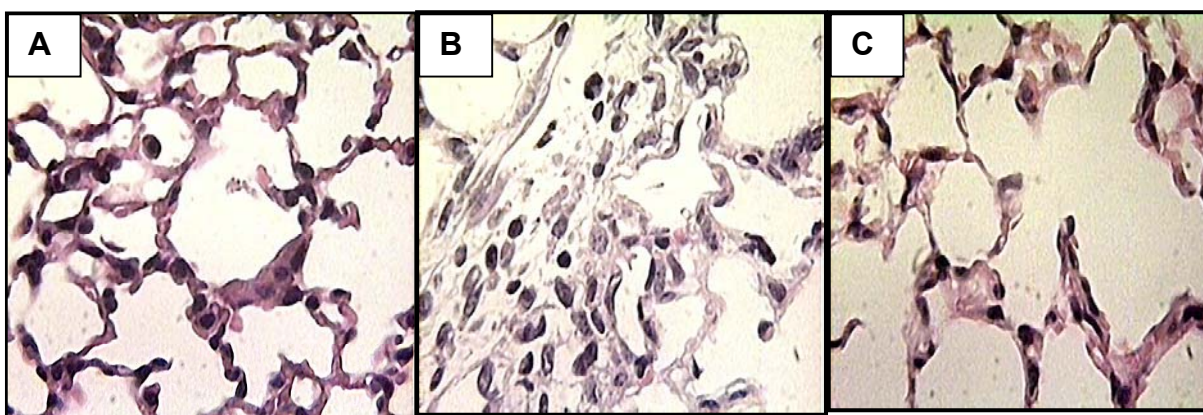


Figura 17 – Análise comparativa de cortes histológicos do pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%). B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração, a organização celular e o edema no pulmão.

Na segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória, o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado duas vezes num intervalo de 12 h, foi capaz de diminuir de forma significativa a infiltração de neutrófilos (grau 2 para 1) e de mononucleares (grau 3 para 2), bem como a hiperplasia de macrófagos no pulmão (grau 1 para grau 0) ( $P < 0,01$ ) (Figura 18 C). Estes resultados foram comparados com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 18 B).

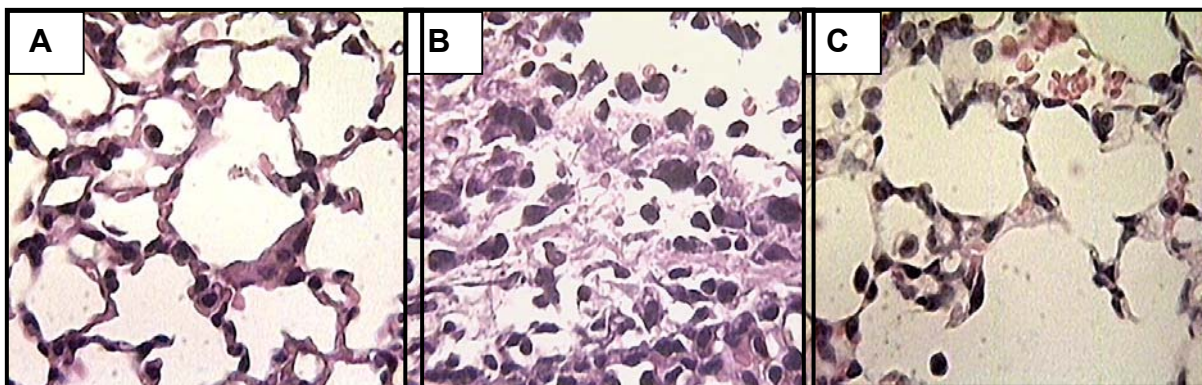
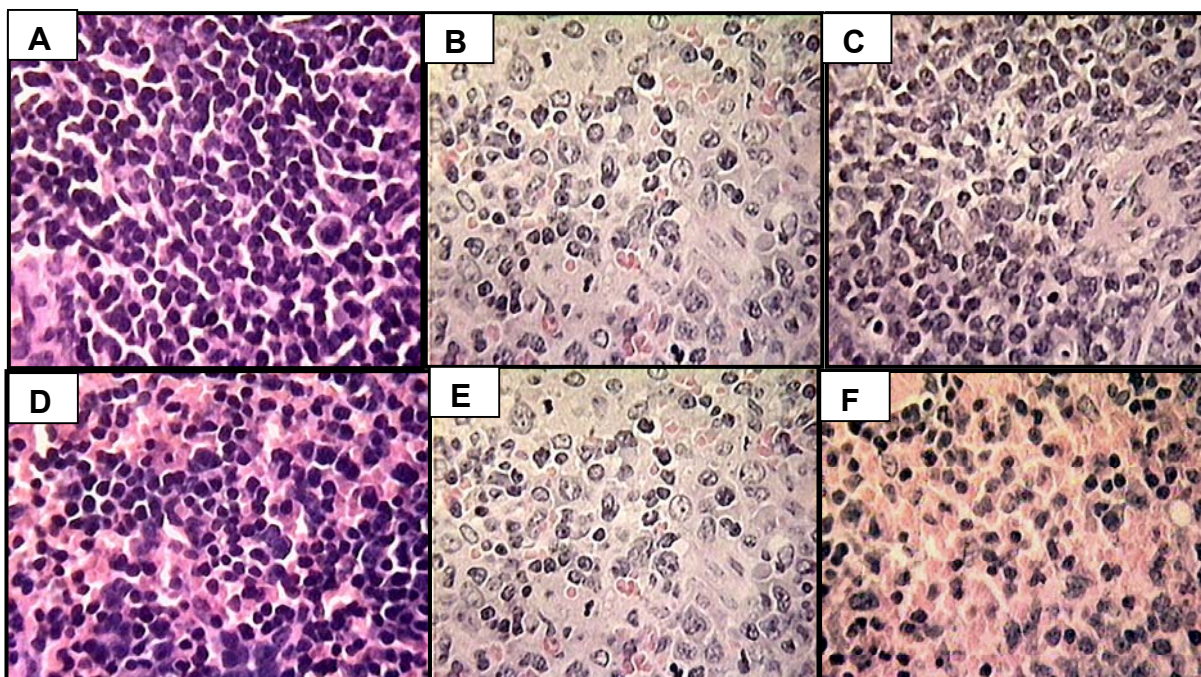


Figura 18 – Análise comparativa de cortes histológicos do pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%). B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, sobre a infiltração e a organização celular no pulmão.

No baço, as Figuras enumeradas (A e D) representam a análise histológica dos tecidos de camundongos tratados somente com solução fisiológica (NaCl, 0,9%), nas polpas branca e vermelha, respectivamente. As Figuras B e E, representam os animais tratados com Cg (1%/cav.).

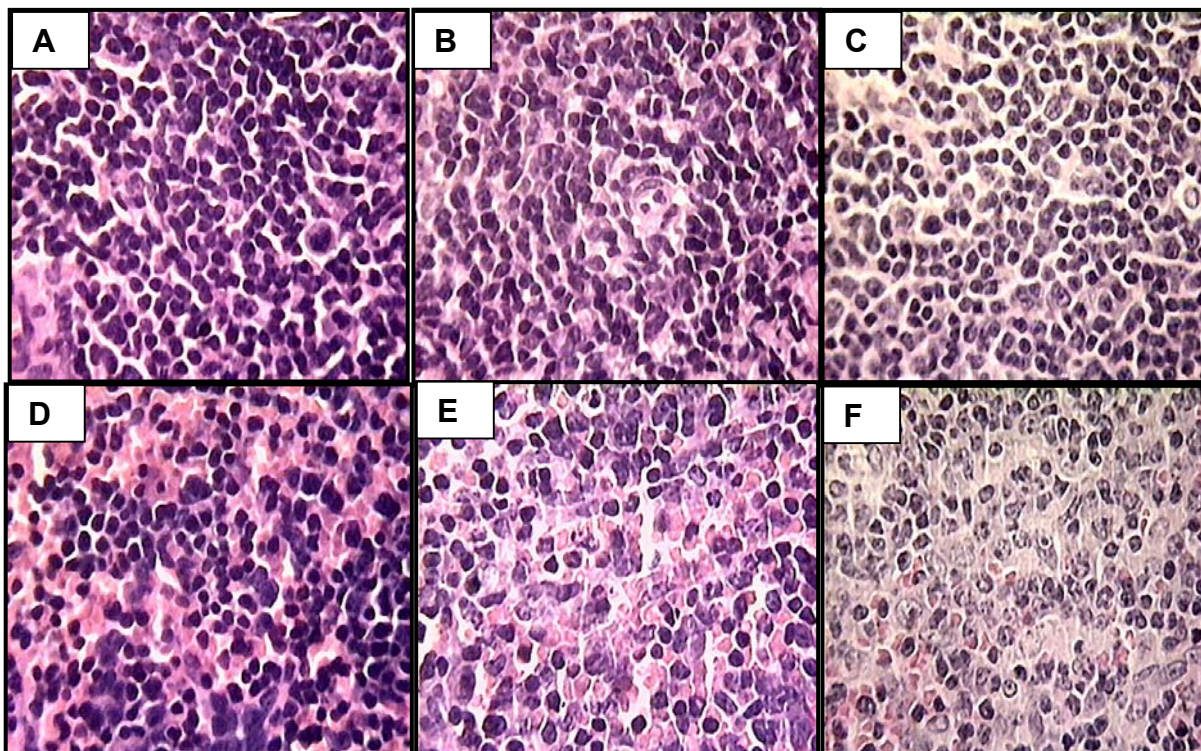
O PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da Cg, diminuiu significativamente a hiperplasia da polpa branca (grau 3 para 1) (Figura 19 C), além do número de leucócitos do tipo neutrófilos na polpa vermelha (grau 3 para 1) ( $P < 0,01$ ) (Figura 19 F) ao compararmos com os grupos controles (animais tratados somente com Cg) (Figuras 19 B: polpa branca e 19 E: polpa vermelha).

Além disso, a análise morfológica celular de animais tratados com PK11195, revelou aumento da apoptose celular na polpa branca (grau 0 para 2) ( $P < 0,01$ ) (Figura 19 C).



**Figura 19** – Análise comparativa de cortes histológicos do baço (polpa branca e vermelha) de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A - Camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa branca. B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), polpa branca. C - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização celular, polpa branca. D - Camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa vermelha. E - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), polpa vermelha. F - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização celular na polpa vermelha, no baço.

Na segunda (48 h) fase da pleurisia, o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes com intervalo de 12 h, diminuiu de forma significativa o centro germinativo na polpa branca (Figura 20 C). Além disso, este fármaco diminuiu significativamente a migração de neutrófilos e de mononucleares na polpa vermelha (grau 3 para 2) ( $P < 0,01$ ) (Figura 20 F), quando comparados com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figuras 20 B: polpa branca e 20 E: polpa vermelha).



**Figura 20** – Análise comparativa de cortes histológicos do baço (polpa branca e vermelha) de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A - Camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa branca. B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), polpa branca. C - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, sobre a infiltração e a organização celular na polpa branca do baço. D - Camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa vermelha. E - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), polpa vermelha. F - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, sobre a infiltração e a organização celular na polpa vermelha do baço.

No fígado, a Figura enumerada (A) representa a análise histológica dos tecidos de camundongos tratados somente com solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e a Figura B, animais tratados com Cg (1%/cav.).

O tratamento dos animais com o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes da Cg), diminuiu de forma significativa o número de neutrófilos, bem como a hiperplasia de células de Kuppfer (grau 2 para 1) (Figura 21 C) ( $P < 0,01$ ) quando compou-se com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 21 B).

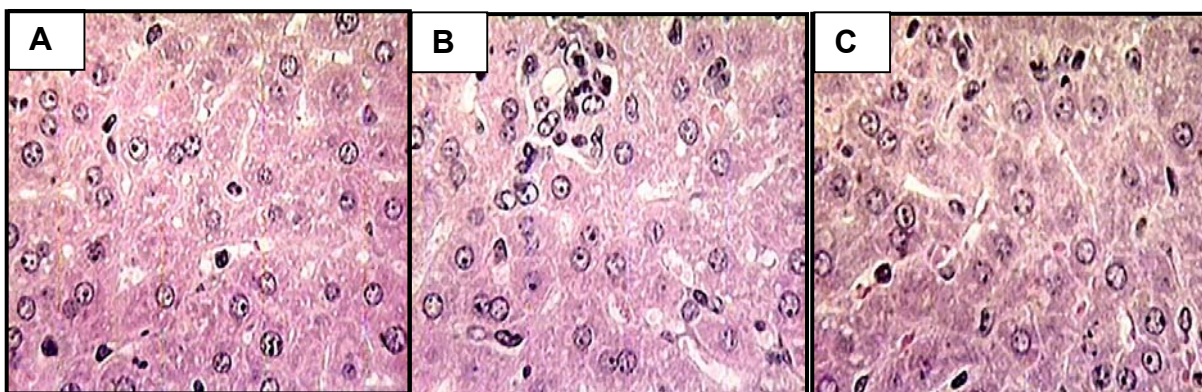


Figura 21 – Análise comparativa de cortes histológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%). B - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização celular no fígado.

Quando se observou o efeito deste fármaco na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado duas vezes num intervalo de 12 h, verificou-se uma significativa diminuição da hiperplasia de células de Kupffer (grau 2 para 0) ( $P < 0,01$ ) (Figura 22 C). É importante ressaltar que este fármaco manteve o número de neutrófilos e de mononucleares além da degeneração hidrópica no fígado (Figura 22 C) quando comparado com animais controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 22 B).

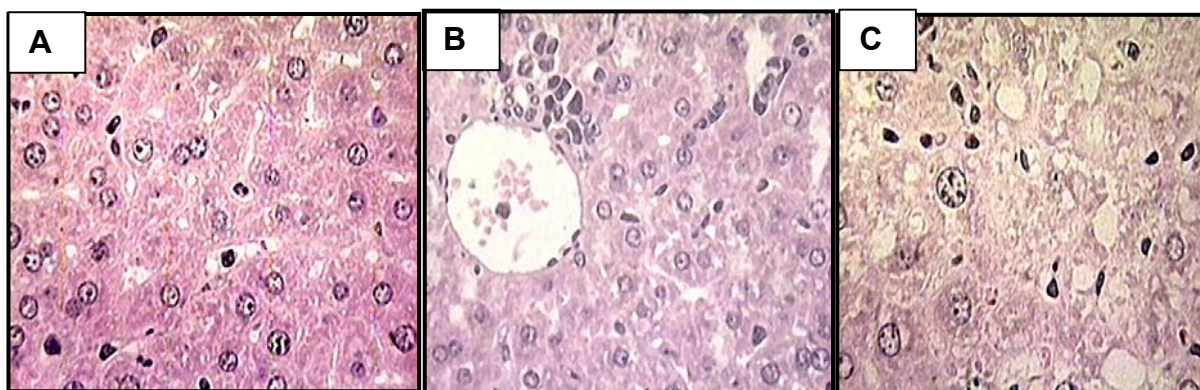


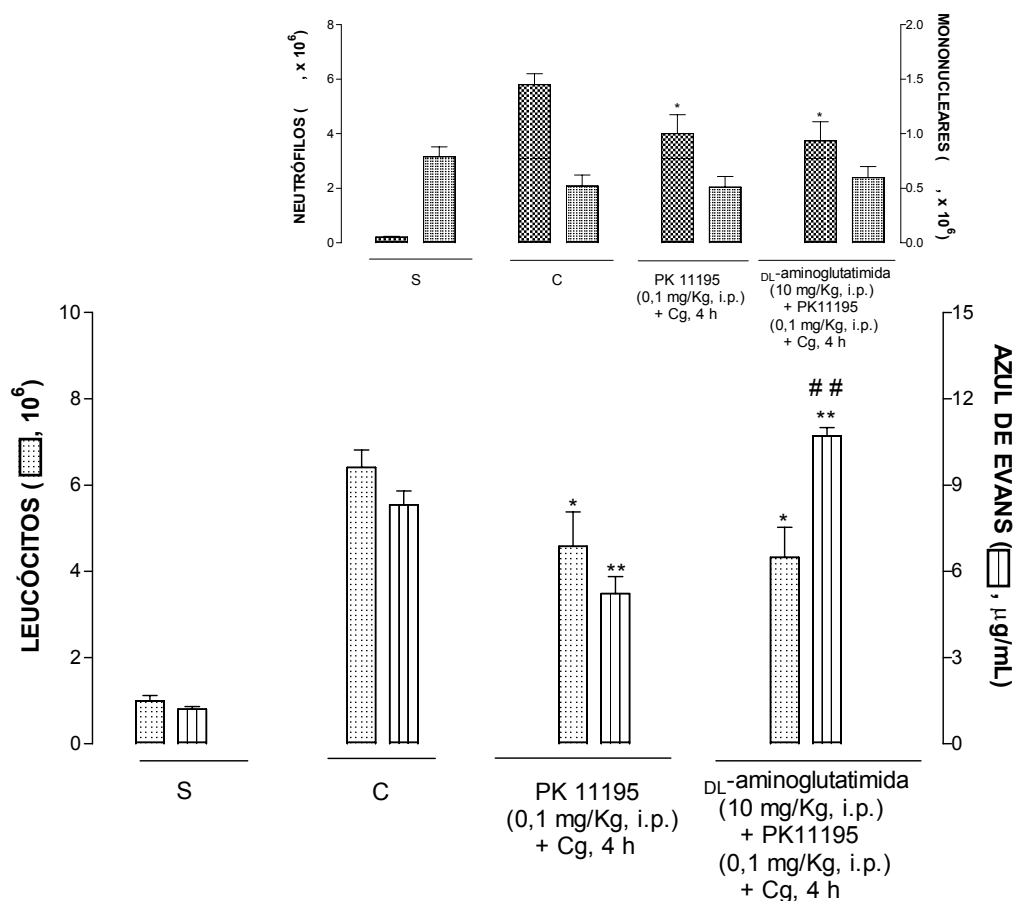
Figura 22 – Análise comparativa de cortes histológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%). B - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, sobre a infiltração e a organização celular no fígado.

## 5.6 EFEITO DO PK11195 SOBRE OS LEUCÓCITOS E A EXSUDAÇÃO NA CAVIDADE PLEURAL DE ANIMAIS TRATADOS COM DL-AMINOGLUTATIMIDA NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

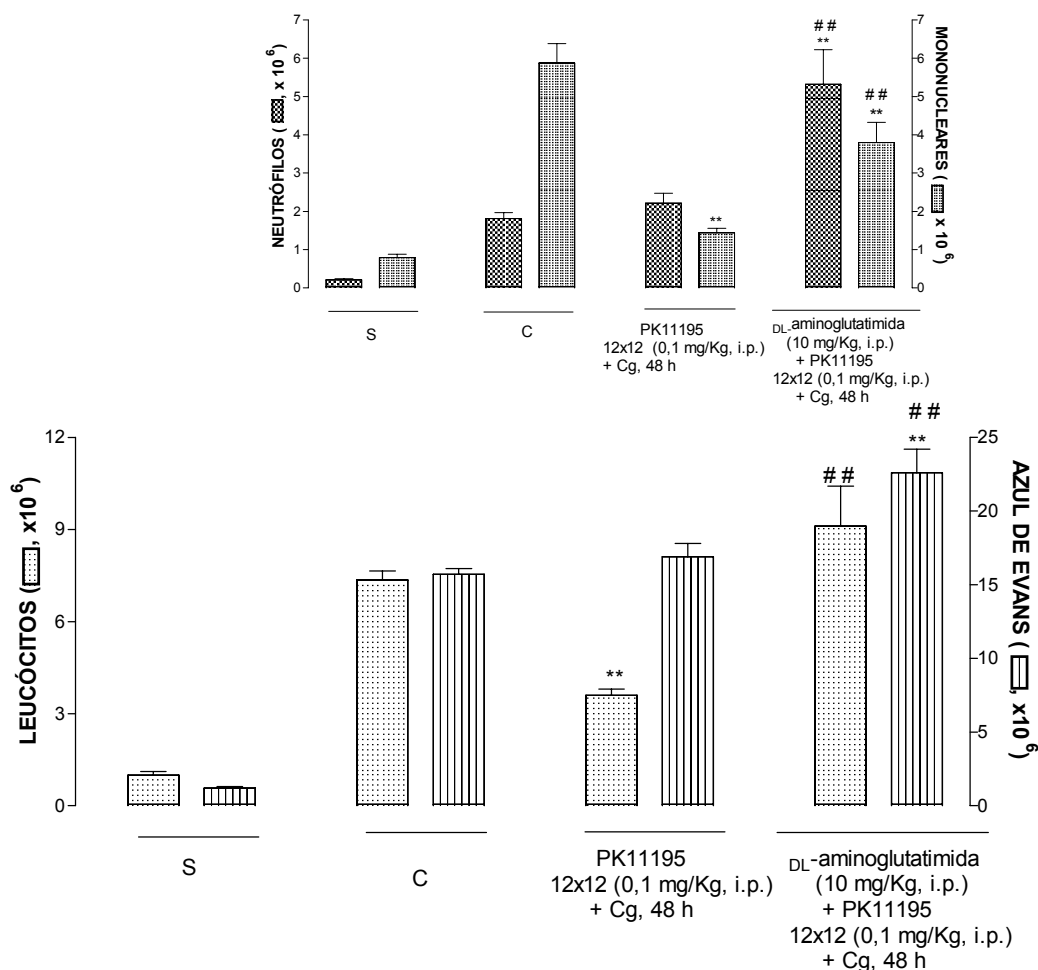
Os resultados obtidos na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, apresentados na Figura 23, demonstram que nos camundongos tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) e PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.) observou-se uma diminuição significativa na migração leucocitária ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,4$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $4,3 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 23), às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $3,7 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 23, *inset*). Neste mesmo grupo de animais, observou-se também um aumento significativo na exsudação na cavidade pleural ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $8,3 \pm 0,5$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $10,7 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 23). Ao compararmos os resultados obtidos dos animais tratados com DL-aminoglutatimida + PK11195 daqueles tratados somente com PK11195 na pleurisia induzida pela Cg, observamos que com relação a exudação, houve uma reversão do efeito do PK11195, uma vez que o PK11195 inibiu a exsudação produzida pela Cg 4 h e o tratamento com a DL-aminoglutatimida aumentou este parâmetro inflamatório ( $P < 0,01$ ) (Figura 23).

Avaliando-se os mesmos parâmetros inflamatórios na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, os camundongos tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) e o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas foi efetivo em inibir significativamente os mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $5,5 \pm 0,3$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $3,8 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 24), mas não os leucócitos totais. Por outro lado nas

mesmas condições experimentais, este fármaco aumentou tanto o número de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $1,8 \pm 0,1$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $5,3 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura, 24) como da exudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $15,7 \pm 0,4$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $22,6 \pm 1,6$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 24, *inset*). Nesta fase a DL-aminoglutatimida reverteu o efeito do PK11195 em relação aos leucócitos totais ( $P < 0,05$ ) (Figura 24), neutrófilos e mononucleares ( $P < 0,05$ ) (Figura 24, *inset*) bem como a exsudação, uma vez que observamos um aumento significativo destes parâmetros inflamatórios ao compararmos com os animais tratados somente com PK11195 ( $P < 0,05$ ) (Figura 24).



**Figura 23** – Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes) sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  - Cg vs PK11195; Cg vs DL-aminoglutatimida + PK11195 e ##  $P < 0,01$  - PK11195 vs DL-aminoglutatimida + PK11195.



**Figura 24** – Efeito do PK11195, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \*\* P < 0,01 – Cg vs PK11195; Cg vs DL-aminoglutatimida + PK11195 e # # P < 0,01 - PK11195 vs DL-aminoglutatimida + PK11195.

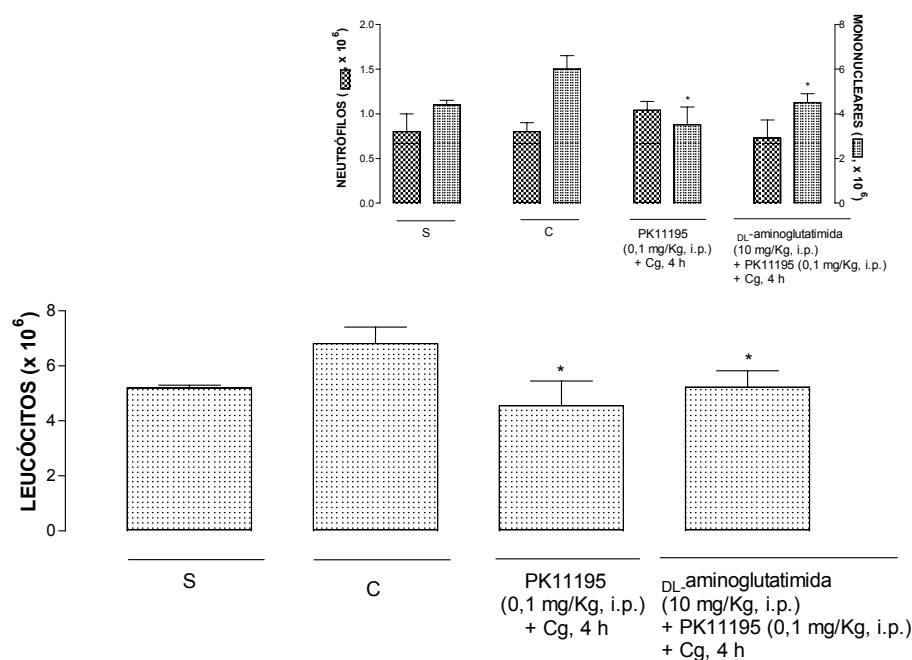
### 5.7 EFEITO DO PK11195 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS NO SANGUE DE ANIMAIS TRATADOS COM DL-AMINOGLUTATIMIDA NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS, 4 E 48 H

Avaliando-se a resposta sistêmica nos grupos de animais tratados previamente (30 min) com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) e PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes da carragenina, observou-se que a associação destes

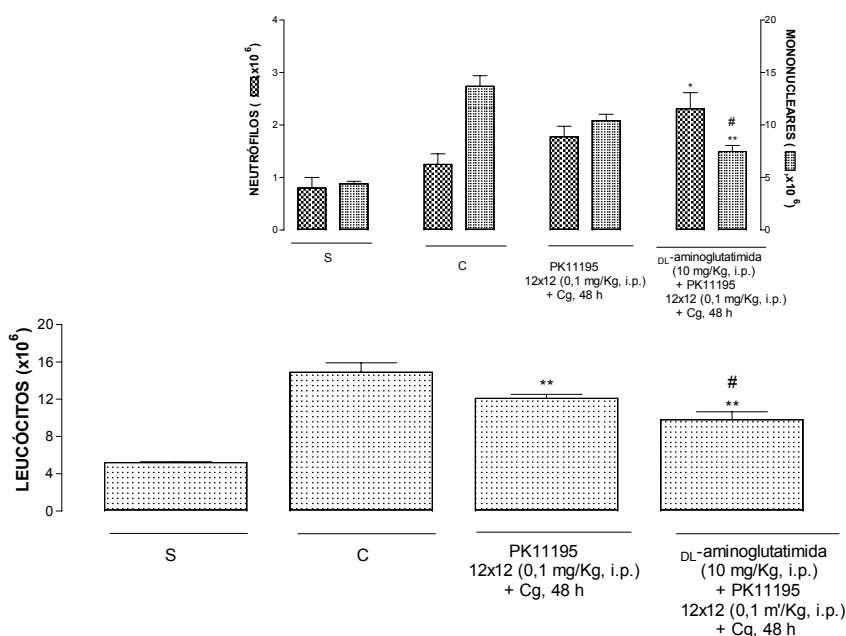


fármacos promoveu uma diminuição dos leucócitos ( $\times 10^6$ ) (S:  $5,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,8 \pm 0,6$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $5,2 \pm 0,6$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 25), às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 4 h:  $6,0 \pm 0,5$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $4,9 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 25, inset), na primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória. Nesta fase, não foi observada alteração significativa entre os grupos de animais tratados somente com PK11195 e os grupos de animais tratados com PK11195 e mais DL-aminoglutatimida.

A Figura 26 mostra que o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas, também promoveu uma diminuição no número de leucócitos ( $\times 10^6$ ) (S:  $5,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $14,9 \pm 1,0$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $9,8 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,05$ ), às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $13,7 \pm 1,0$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $7,5 \pm 0,6$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 26, inset). Além disso, neste mesmo protocolo experimental, também foi observado um aumento do número de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $1,2 \pm 0,2$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $2,3 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 26, inset). Nesta fase que o grupo de animais tratados com DL-aminoglutatimida reverteu o efeito do PK11195, uma vez que observamos uma diminuição significativa dos leucócitos totais ( $P < 0,05$ ) (Figura 19) e dos mononucleares ( $P < 0,05$ ) (Figura 26, inset) em relação ao grupo de animais tratados somente com PK11195.



**Figura 25** – Efeito do PK11195, sobre os leucócitos no sangue de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutimida na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre os leucócitos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos seus respectivos controles.



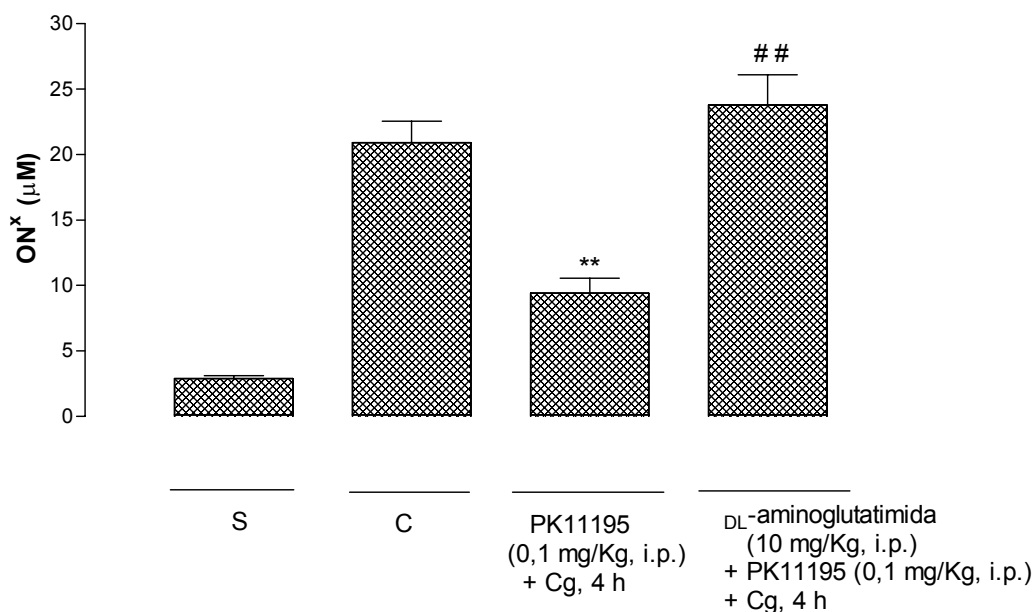
**Figura 26** – Efeito do PK11195, sobre os leucócitos no sangue de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutimida na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 - Cg vs PK11195; Cg vs DL-aminoglutimida + PK11195 e # P < 0,05 - PK11195 vs DL-aminoglutimida + PK11195.

### 5.8 EFEITO DO PK11195 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA MIELOPEROXIDASE, DA ADENOSINA-DEAMINASE E DE NITRITO/NITRATO (ON<sup>x</sup>), EM ANIMAIS TRATADOS COM DL-AMINOGLUTATIMIDA NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS, 4 E 48 H

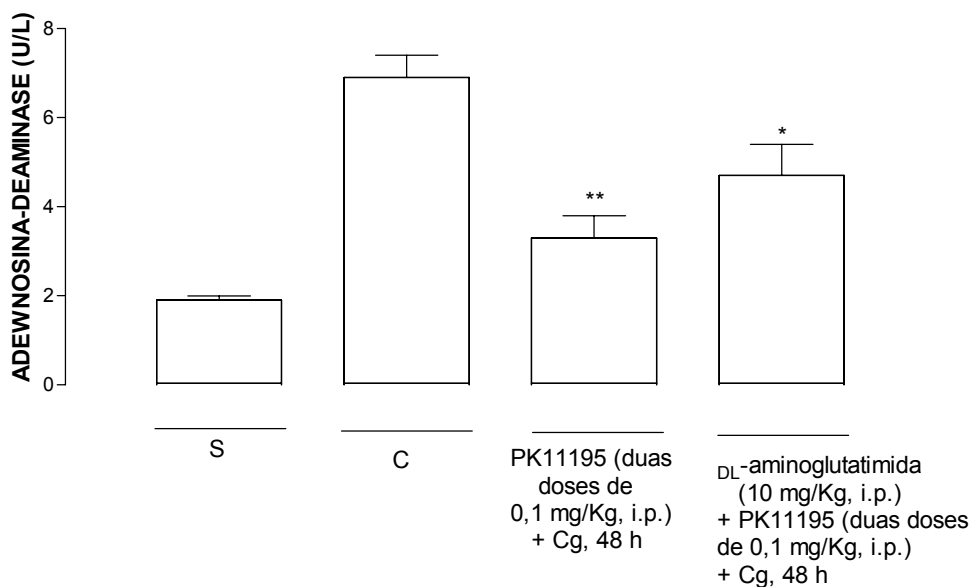
O PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), 1 h antes da carragenina, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, inibiu somente os níveis de óxido nítrico (ON<sup>x</sup>).

A Figura 27 mostra que, em camundongos tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) mais PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), 1 h antes da carragenina, houve uma reversão nos níveis de óxido nítrico (ON<sup>x</sup>) quando comparado com grupo de animais tratados somente com o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., 1 h antes da carragenina) ( $\mu\text{M}$ ) (S:  $2,9 \pm 0,2$ ; C:  $20,9 \pm 1,6$ ; PK11195:  $9,4 \pm 1,1$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $23,8 \pm 2,3$ ) ( $P < 0,01$ ).

Na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, o PK11195 foi eficaz em inibir somente os níveis de adenosina-deaminase. Como demonstra a figura 28, animais tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) mais PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., duas doses num intervalo de 12 h), não alterou de forma significativa os níveis de adenosina deaminase (U/L) quando comparado com grupo de animais tratados somente com o PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p., duas doses num intervalo de 12 h) (S:  $1,9 \pm 0,1$ ; C:  $6,9 \pm 0,5$ ; PK11195:  $3,3 \pm 0,5$ ; DL-aminoglutatimida + PK11195:  $4,7 \pm 0,7$ ).



**Figura 27** – Efeito do PK11195, sobre os níveis de nitrato/nitrito (ON<sup>x</sup>) em camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre os níveis de nitrato/nitrito (µM). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre nitrato/nitrito (ON<sup>x</sup>). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \*\* P < 0,01 – Cg vs PK11195; ## PK11195 vs DL-aminoglutatimida + PK11195.



**Figura 28** - Efeito do PK11195, sobre os níveis de adenosina-deaminase em camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida na segunda fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do PK11195 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 h, sobre os níveis de adenosina-deaminase (U/L). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a adenosina-deaminase. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 – Cg vs PK11195.

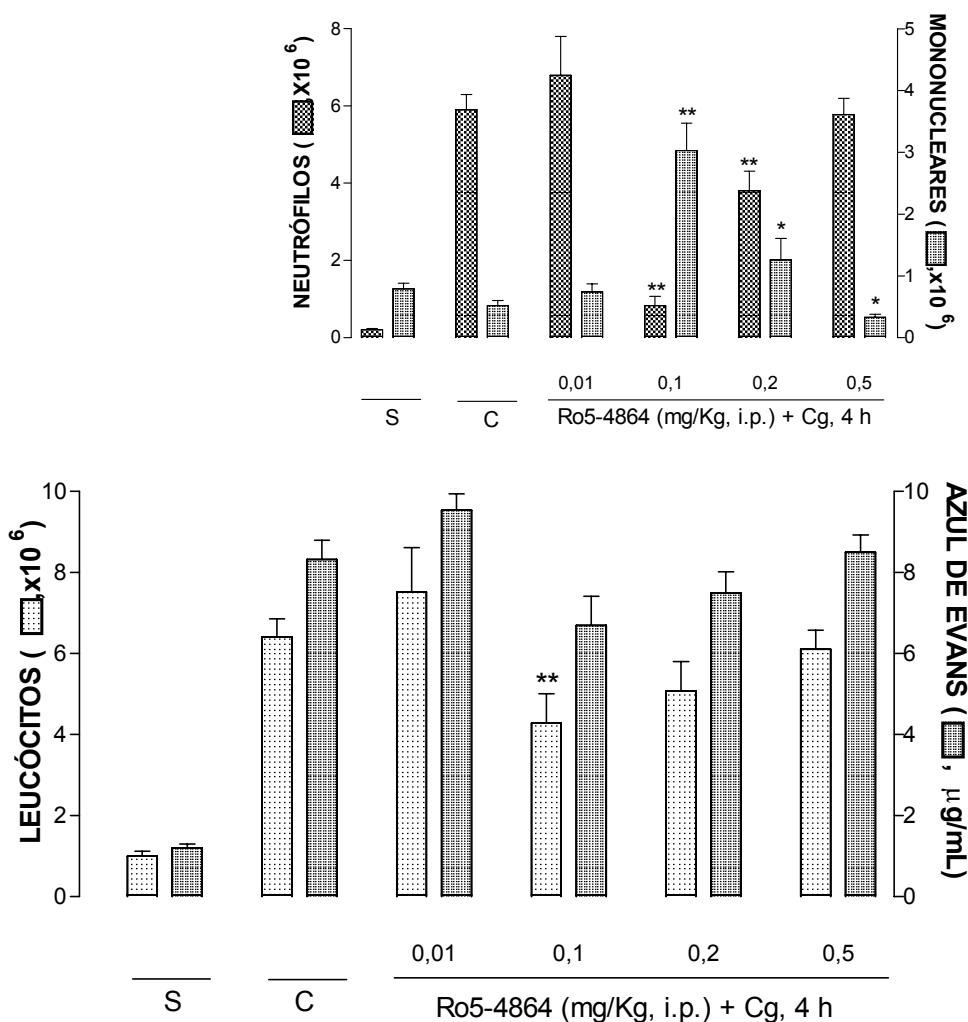
### 5.9 EFEITO DO Ro5-4864 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS E EXSUDATO EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

Como mostra a figura 29, o Ro5-4864 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., inibiu significativamente a migração leucocitária quando administrado 0,5 h antes da carragenina ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,4$ ; Ro5-4864:  $4,3 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,01$ ), às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; Ro5-4864:  $0,6 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 29, *inset*). A inibição de neutrófilos também foi demonstrada quando o Ro5-4864 foi administrado na dose de 0,2 mg/Kg, i.p. ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; Ro5-4864:  $3,8 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 29, *inset*). Neste mesmo tempo de tratamento prévio, o Ro5-4864 inibiu também a migração de mononucleares quando administrado na dose de 0,5 mg/Kg, i.p. ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $0,5 \pm 0,1$ ; Ro5-4864:  $0,3 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 29, *inset*). É importante ressaltar que o Ro5-4864 (0,1 e 0,2 mg/Kg, i.p.) quando administrado 0,5 h antes do agente flogístico, também aumentou significativamente o número de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $0,5 \pm 0,1$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $3,0 \pm 0,4$  e 0,2 mg/Kg, i.p.:  $1,2 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 29, *inset*). Com relação a exsudação o Ro5-4864 não alterou este parâmetro inflamatório (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $8,3 \pm 0,5$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $9,5 \pm 0,4$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $6,7 \pm 0,7$ ; 0,2 mg/Kg, i.p.:  $7,5 \pm 0,5$ ; 0,5 mg/Kg, i.p.:  $8,5 \pm 0,4$ ).

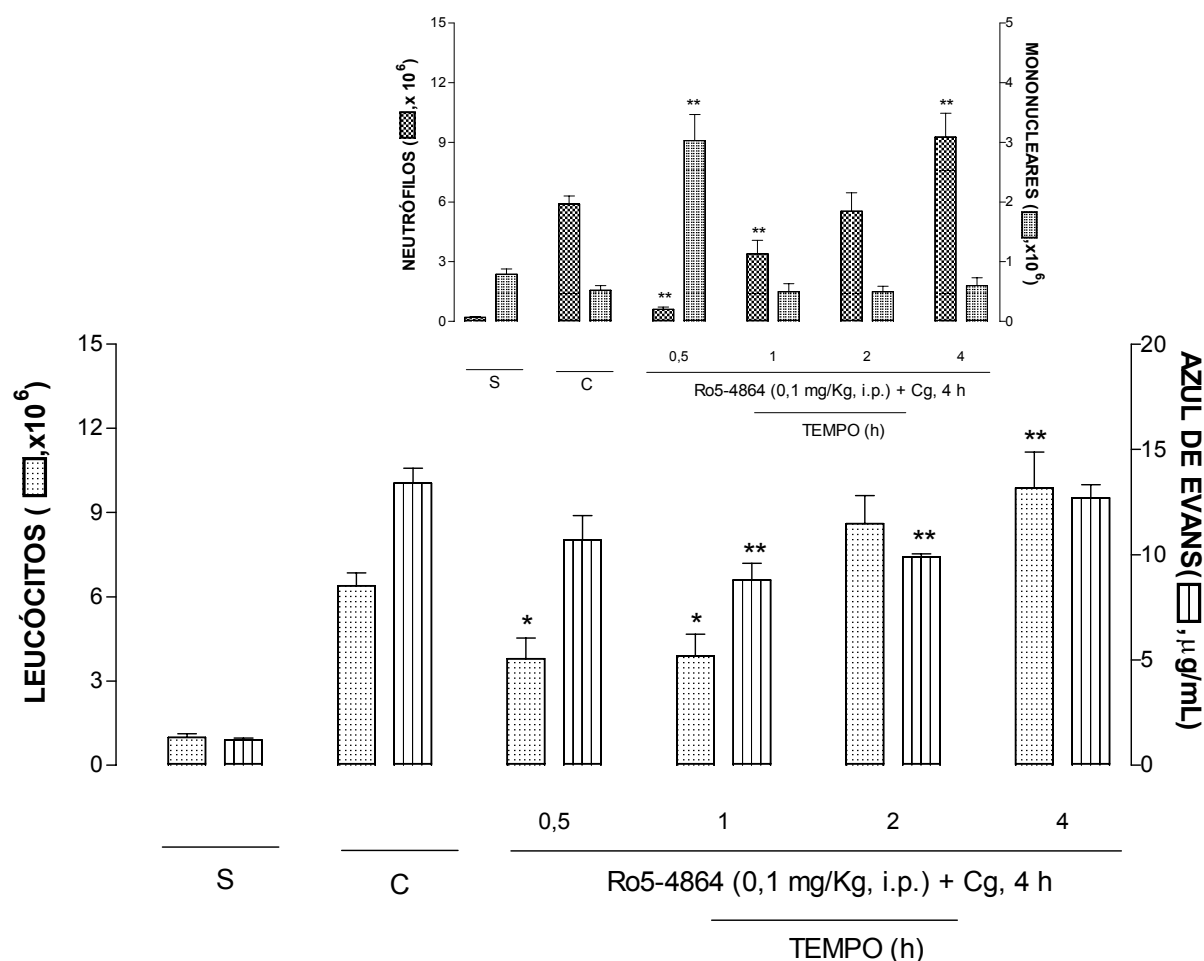
Na avaliação do perfil temporal deste fármaco, observamos que o Ro5-4864 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., inibiu significativamente a migração de leucócitos quando administrado também 1 h antes da Cg ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,4$ ; 1 h:  $3,9 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 30), às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; 1 h:  $3,4 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 30, *inset*). Porém, quando administrado 4 h antes da carragenina, o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), promoveu um aumento no

número de leucócitos ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,4$ , Ro5-4864:  $9,9 \pm 1,2$ ) às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ , Ro5-4864:  $9,2 \pm 1,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 30, *inset*).

Neste grupo de experimentos, o grau de exsudação diminuiu significativamente quando o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) foi administrado nos tempos de 1 e 2 horas antes da carragenina ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg, 4 h:  $8,3 \pm 0,5$ ; 1 h:  $5,5 \pm 0,5$  e 2 h:  $6,1 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 30).



**Figura 29** – Efeito do Ro5-4864, sobre a migração celular na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses de Ro5-4864 (0,01-0,5 mg/Kg, i.p.) administradas 0,5 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ ) em relação aos respectivos controles.



**Figura 30** – Avaliação do perfil temporal do Ro5-4864, sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado de 0,5 a 4 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

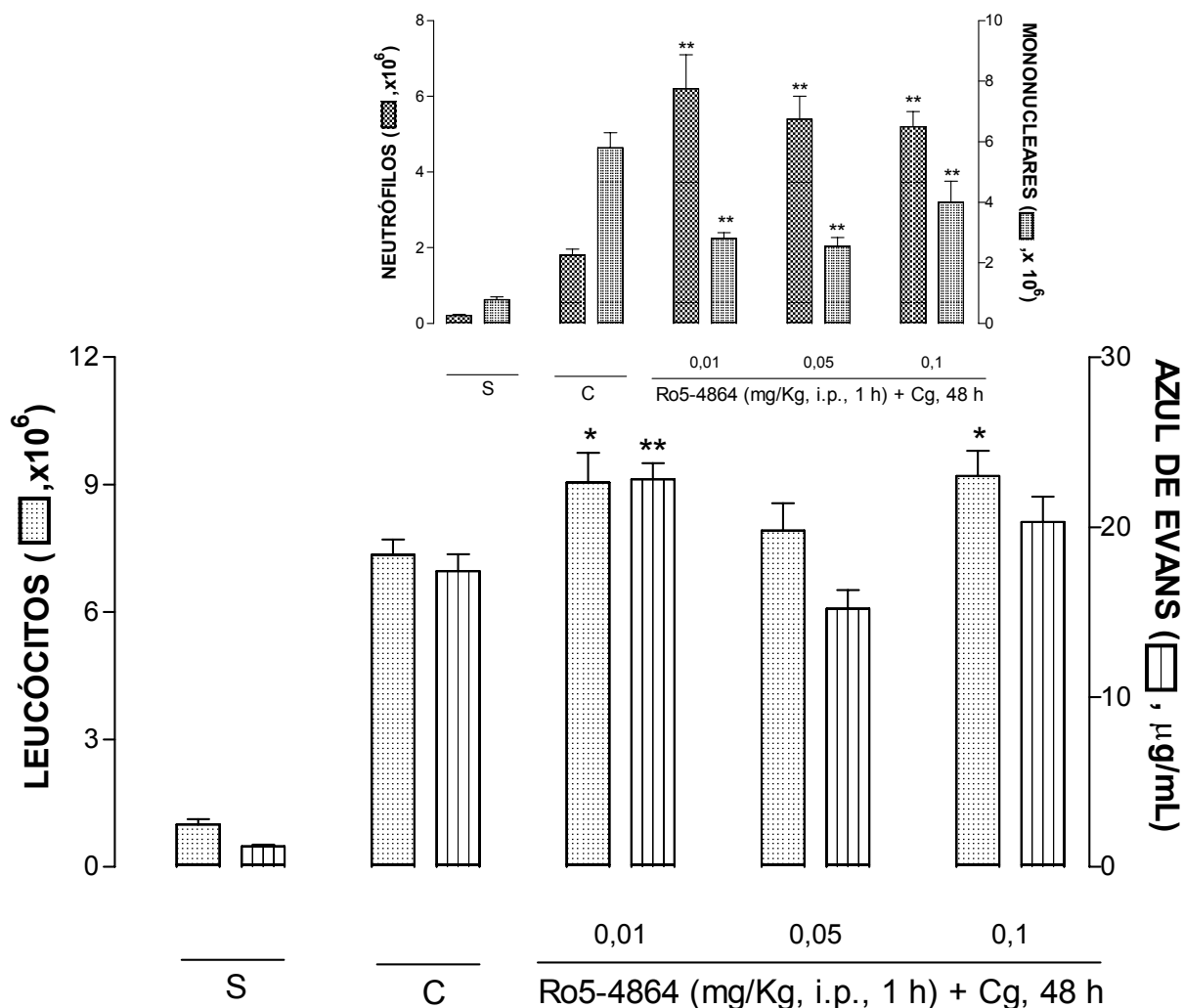
Avaliando-se a segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, observou-se que o Ro5-4864 inibiu significativamente a migração de mononucleares nas doses de 0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p. 1 h antes do agente flogístico (x10<sup>6</sup>) (S: 0,8±0,1; Cg 48 h: 5,5±0,3; 0,01 mg/Kg, i.p.: 2,8±0,2, 0,05 mg/Kg, i.p.: 2,5±0,3 e 0,1 mg/Kg, i.p.: 4,0±0,7) (P < 0,05) (Figura 31). Ressalta-se que neste grupo experimental houve um aumento significativo do número de leucócitos quando o Ro5-4864 foi administrado nas doses de 0,01 e 0,1 mg/Kg, i.p. (x10<sup>6</sup>) (S: 1,0±0,1; Cg 48 h: 7,3±0,4, 0,01 mg/Kg,

i.p.  $9,0 \pm 0,7$  e  $0,1$  mg/Kg, i.p.:  $9,2 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 31, *inset*), com aumento dos neutrófilos, quando administrados nas doses  $0,01$  a  $0,1$  mg/Kg, i.p., 1 h antes da carragenina ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $1,8 \pm 0,1$ ,  $0,01$  mg/Kg, i.p.:  $6,2 \pm 0,9$ ,  $0,05$  mg/Kg, i.p.:  $5,4 \pm 0,5$  e  $0,1$  mg/Kg, i.p.:  $5,2 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 31, *inset*). Houve também um aumento significativo nos níveis da exsudação quando o Ro5-4864 foi administrado na dose de  $0,01$  mg/Kg, i.p. 1 h antes do agente flogístico ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $15,7 \pm 0,4$ ,  $0,01$  mg/Kg, i.p.:  $20,6 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 31, *inset*).

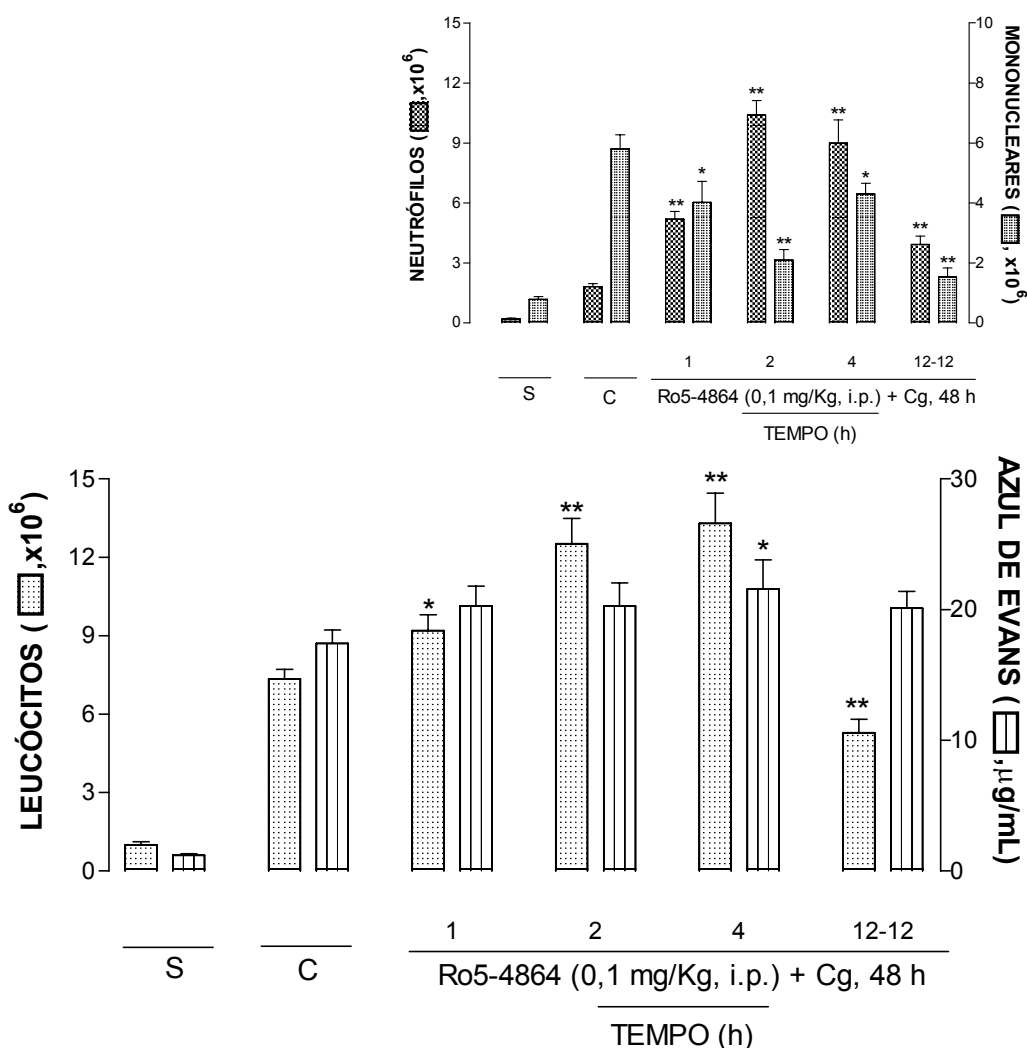
O perfil temporal demonstra que este fármaco na dose de  $0,1$  mg/Kg, i.p. promoveu uma diminuição significativa dos leucócitos totais quando administrado somente em duas doses de  $0,1$  mg/Kg, i.p. num intervalo de 12 horas ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $7,3 \pm 0,3$ , Ro5-4864:  $5,3 \pm 0,5$ ) (Figura 32) ( $P < 0,01$ ), às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $5,5 \pm 0,3$ , Ro5-4864:  $1,5 \pm 0,2$ ) (Figura 32, *inset*) ( $P < 0,01$ ). Nos tempos de tratamento prévio de 1 a 4 h, o Ro5-4864 também foi capaz de inibir significativamente os mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $5,5 \pm 0,3$ , 1 h:  $4,0 \pm 0,7$ , 2 h:  $2,1 \pm 0,3$  e 4 h:  $4,3 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 32, *inset*). Neste mesmo protocolo, o Ro5-4864 promoveu um aumento no número de leucócitos quando administrados nos períodos de tempo de 1 a 4 horas ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $7,3 \pm 0,4$ , 1 h:  $9,2 \pm 0,6$ , 2 h:  $12,5 \pm 0,9$  e 4 h:  $13,4 \pm 1,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 32), às custas de neutrófilos, que aumentou tanto de 1 a 4 horas como também quando administrado com duas doses ( $0,1$  mg/Kg, i.p.) num intervalo de 12 horas (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $1,8 \pm 0,1$ , 1 h:  $5,2 \pm 0,4$ , 2 h:  $10,4 \pm 0,7$ , 4 h:  $9,0 \pm 1,1$ , 12x12 h:  $3,9 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 32, *inset*). Além disso, nesta fase (48 h) da resposta inflamatória, o Ro5-4864 ( $0,1$  mg/Kg, i.p.), administrado 4 horas antes da Cg, aumentou



significativamente os níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $15,7 \pm 0,4$ , Ro5-4864:  $19,4 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 32).



**Figura 31** - Efeito do Ro5-4864, sobre a migração celular e a exsudação na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses de Ro5-4864 (0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p.) administradas 1 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ ) em relação aos respectivos controles.



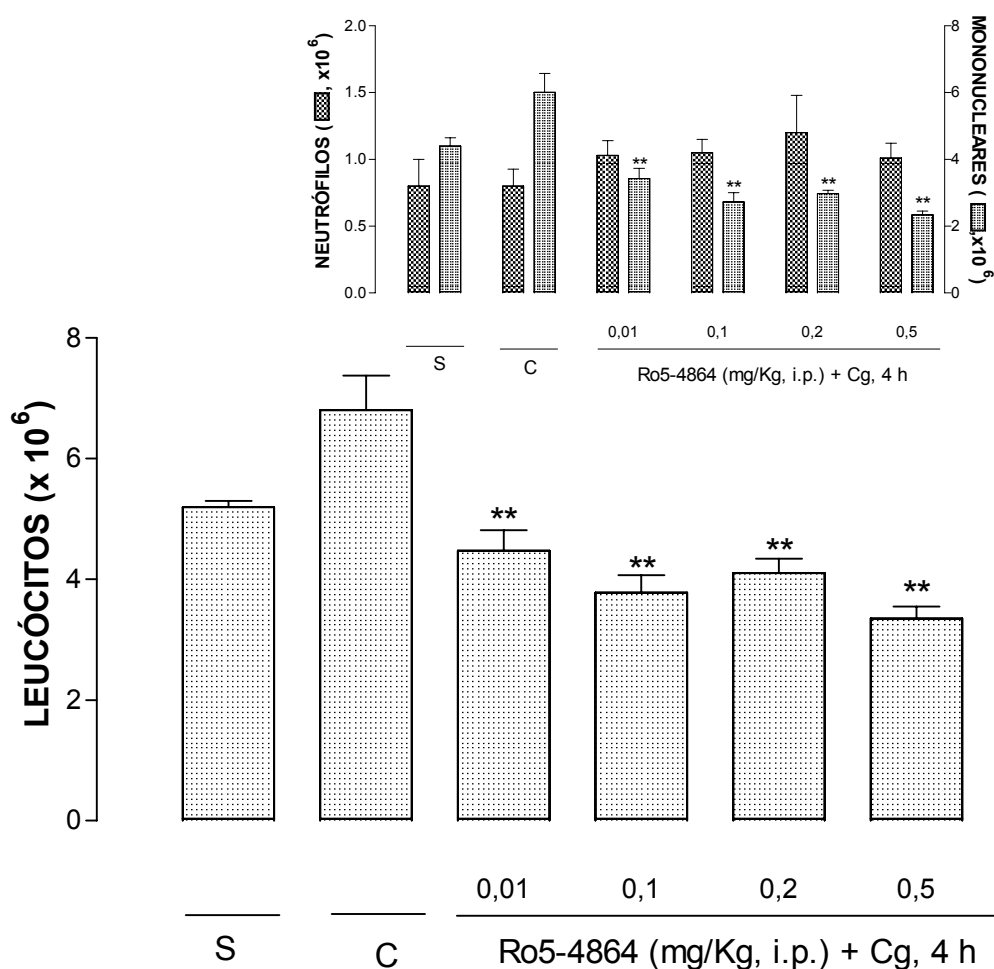
**Figura 32** - Avaliação do perfil temporal do Ro5-4864, sobre a migração celular e a exsudação na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado de 1 a 4 h ou em duas doses num intervalo de 12 horas. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\*P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

### 5.10 EFEITO DO Ro5-4864 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS NO SANGUE DE CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

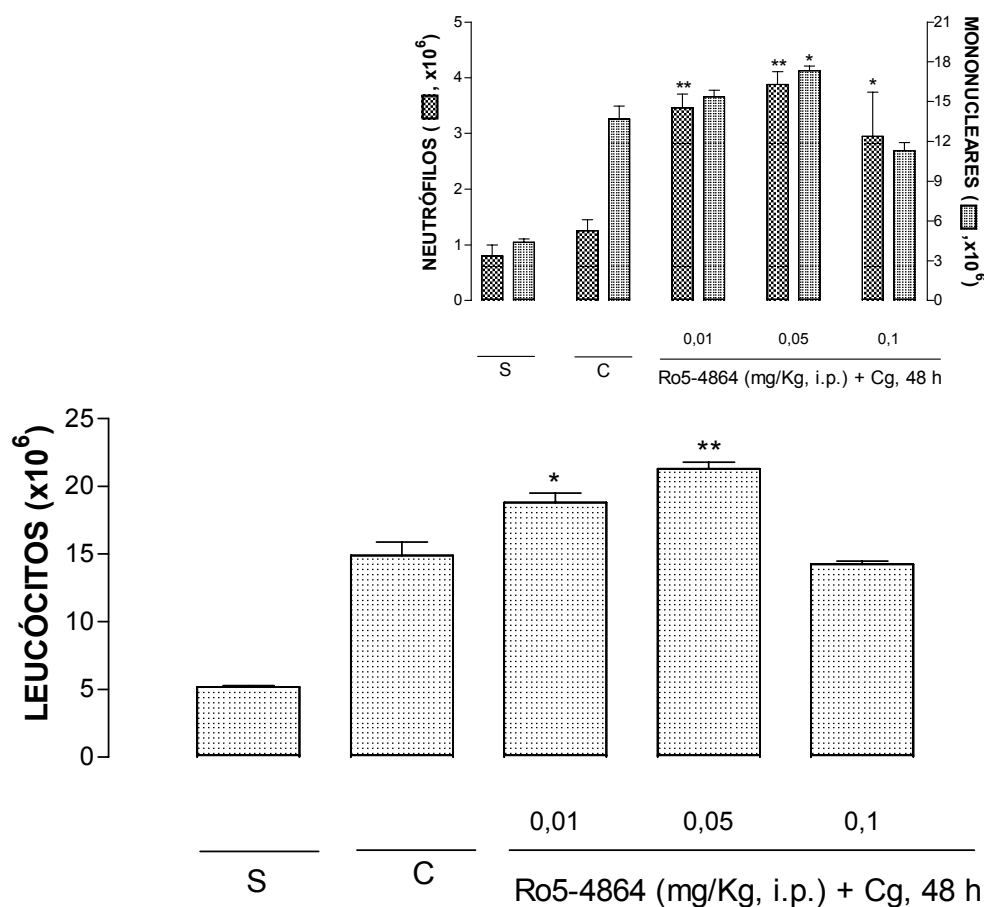
O efeito sistêmico deste fármaco foi avaliado como demonstra a figura 33. Observou-se que o Ro5-4864 nas doses de 0,01 a 0,5 mg/Kg, i.p. administrado 0,5 h antes do agente flogístico diminuiu os leucócitos totais ( $\times 10^6$ ) (S:  $5,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,8 \pm 0,6$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $4,4 \pm 0,3$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $3,8 \pm 0,3$ ; 0,2 mg/Kg, i.p.:  $4,1 \pm 0,2$  e

0,5 mg/Kg, i.p.:  $3,3 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ), às custas de mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 4 h:  $6,0 \pm 0,5$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $3,4 \pm 0,3$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $2,7 \pm 0,2$ ; 0,2 mg/Kg, i.p.:  $2,9 \pm 0,1$  e 0,5 mg/Kg, i.p.:  $2,3 \pm 0,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 33, *inset*) em relação com os animais tratados com Cg.

Este efeito sistêmico também foi avaliado na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, pelo qual o Ro5-4864 aumentou significativamente os leucócitos totais quando administrado nas doses de 0,01 e 0,05 mg/Kg, i.p. ( $\times 10^6$ ) (S:  $5,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $14,9 \pm 1,0$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $18,8 \pm 0,7$  e 0,05 mg/Kg, i.p.:  $21,3 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 34), às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $1,2 \pm 0,2$ ; 0,01 mg/Kg, i.p.:  $3,4 \pm 0,2$  e 0,05 mg/Kg, i.p.:  $3,9 \pm 0,2$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 34, *inset*). Observa-se também um aumento no número de neutrófilos quando o Ro5-4864 foi administrado na dose de 0,1 mg/Kg, i.p. ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $1,2 \pm 0,2$ ; 0,1 mg/Kg, i.p.:  $2,9 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,05$ ) e de mononucleares quando este fármaco foi administrado na dose de 0,05 mg/Kg, i.p. ( $\times 10^6$ ) (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $13,7 \pm 1,0$ ; 0,05 mg/Kg, i.p.:  $17,3 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 34, *inset*). Os resultados apresentados foram comparados com o grupo-controle (animais tratados com Cg).



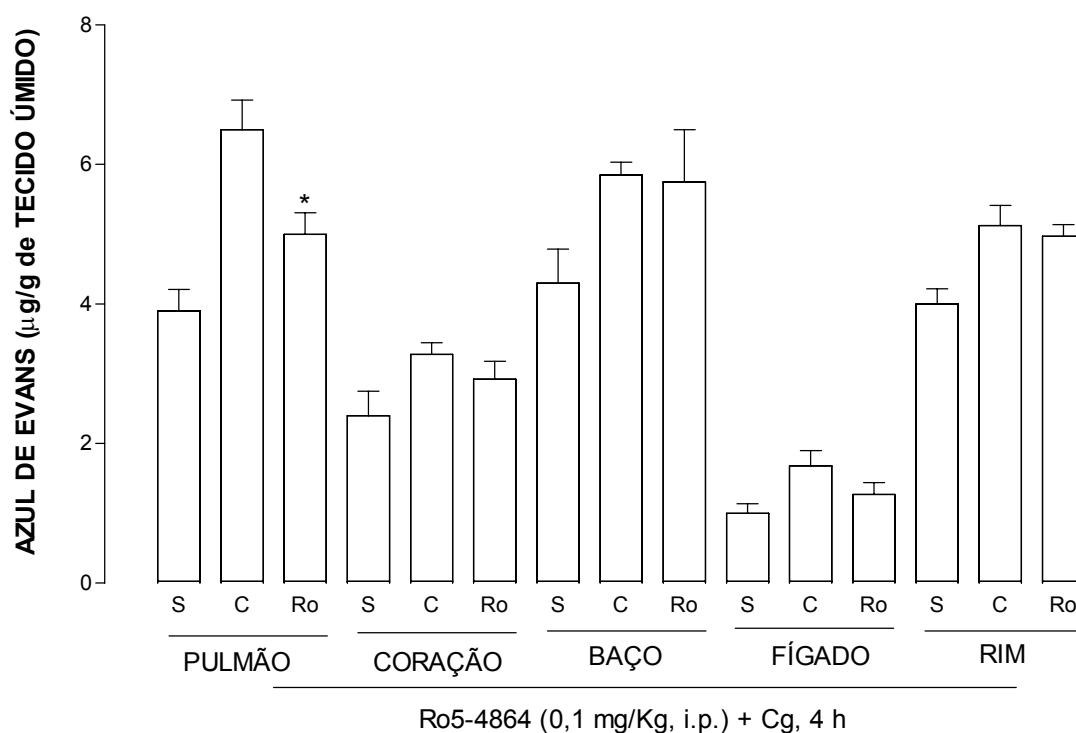
**Figura 33** – Efeito de diferentes doses do Ro55-4864, sobre os leucócitos no sangue na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses de Ro5-4864 (0,01-0,5 mg/Kg, i.p.) administradas 0,5 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.



**Figura 34** - Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de leucócitos no sangue na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Efeito de diferentes doses de Ro5-4864 (0,01 a 0,1 mg/Kg, i.p.) administradas 1 h antes da carragenina. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05 e \*\* P < 0,01) em relação aos respectivos controles.

### 5.11 EFEITO DO Ro5-4864 SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

Seguindo o protocolo experimental, o Ro5-4864 na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória da pleurisia induzida pela carragenina, alterou significativamente os níveis de azul de Evans apenas no pulmão (S: 3,9±0,3; Cg 4 h: 6,5± 0,4; Ro5-4864: 5,0±0,3) (P < 0,05) (Figura 35).



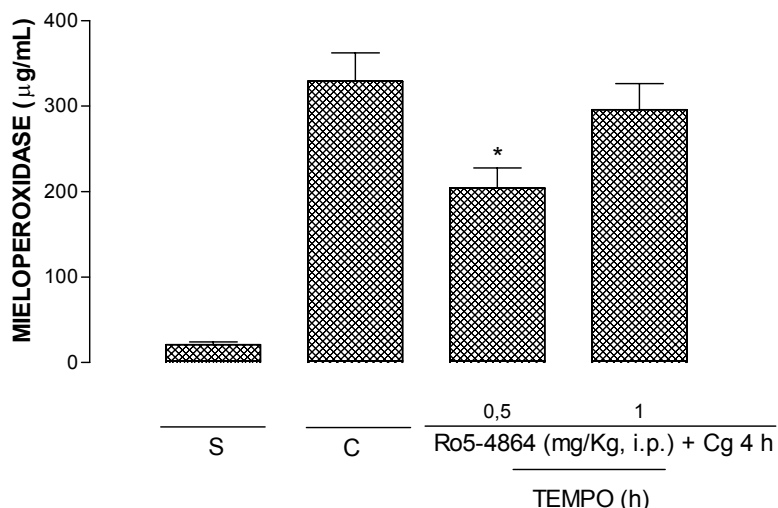
**Figura 35** - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p. 1 h antes da carragenina) sobre a permeabilidade vascular tecidual (pulmão, coração, baço, fígado e rim) na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%). Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\* P < 0,05) em relação aos respectivos controles.

## 5.12 EFEITO DO RO5-4864 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA MIELOPEROXIDASE, DA ADENOSINA-DEAMINASE E DE NITRITO/NITRATO (ON<sup>x</sup>), EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

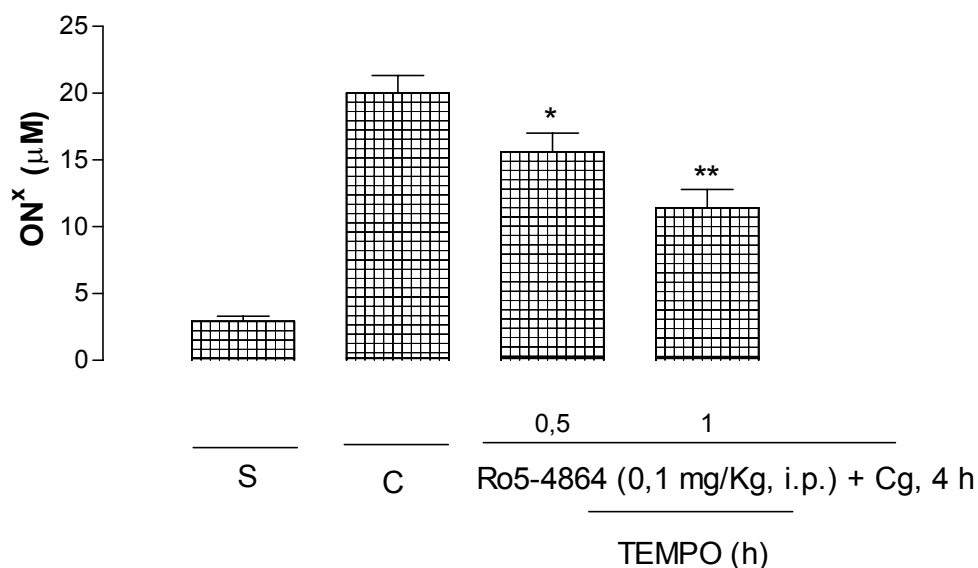
O Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) inibiu significativamente as concentrações da mieloperoxidase somente quando administrado 0,5 h antes do agente flogístico (μg/mL) (S: 21,0±3,2; Cg 4 h: 329±33,3, Ro5-4864: 204,3±23,3) (P < 0,05) (Figura 36).

Neste mesmo grupo de experimentos, o Ro5-4864 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., foi eficaz em inibir os níveis de nitrito/nitrato (ON<sup>x</sup>) quando administrado 0,5 e 1 h antes da Cg (μM) (S: 2,9±0,4; Cg 4 h: 20,9±1,6, 0,5 h: 15,7±1,4, 1 h: 11,4±1,4) (P < 0,05) (Figura 37). Na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória o Ro5-4864 (0,1

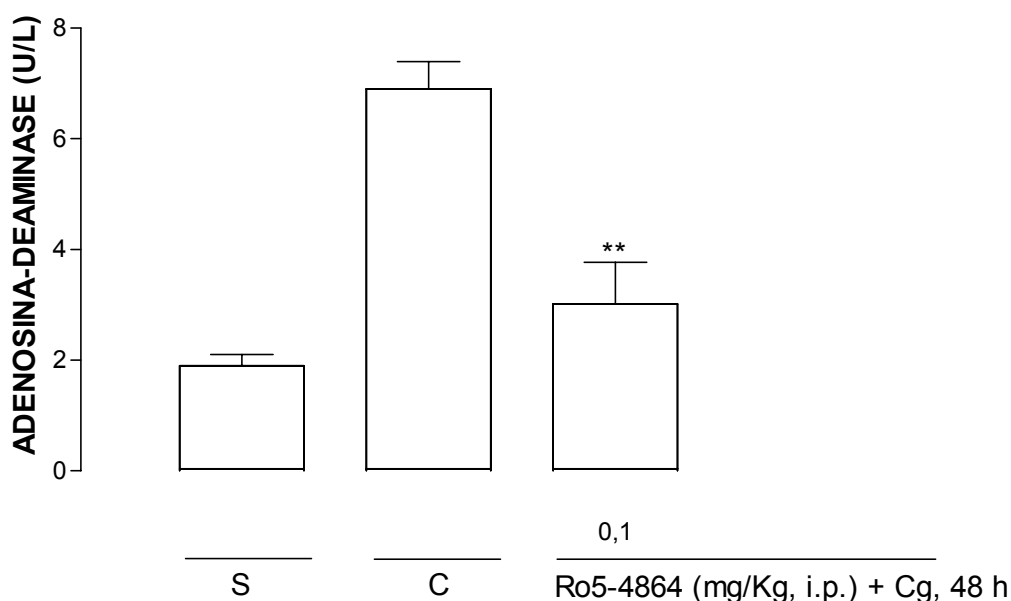
mg/Kg, i.p.) administrado em duas doses num intervalo de 12 horas, inibiu significativamente somente as concentrações da adenosina-deaminase (U/L) (S:  $1,9 \pm 0,2$ ; C:  $6,9 \pm 0,5$ ; Ro5-4864:  $3,0 \pm 0,7$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 38).



**Figura 36** - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 e 1 h antes da carragenina sobre os níveis da mieloperoxidase na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%). Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*  $P < 0,05$ ) em relação aos respectivos controles.



**Figura 37** - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) administrado 0,5 e 1 h antes da carragenina sobre os níveis de nitrato/nitrito ( $ON^x$ ) na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%). Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ ) em relação aos respectivos controles.



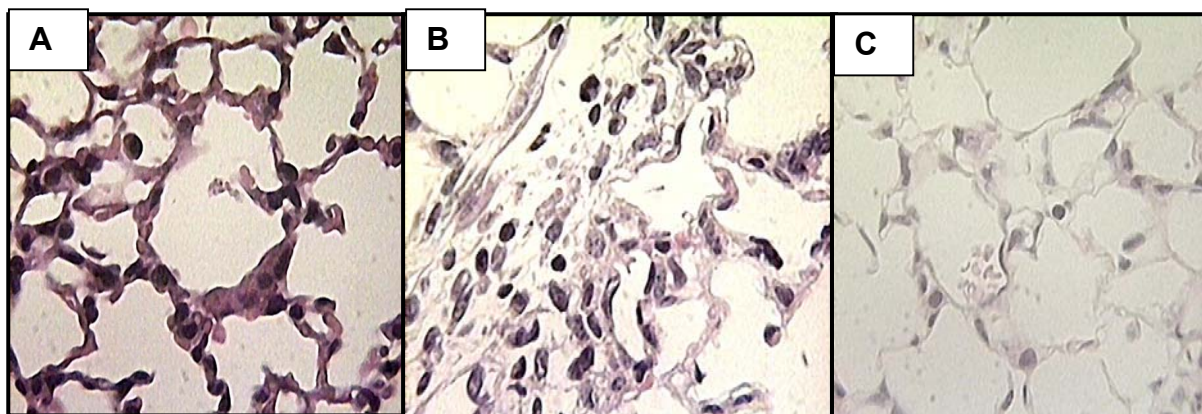
**Figura 38** - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas sobre os níveis de adenosina-deaminase na segunda (48 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina. Cada coluna representa a média de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (\*\*  $P < 0,01$ ) em relação aos respectivos controles.

### 5.13 EFEITO DO Ro5-4864 SOBRE OS LEUCÓCITOS TECIDUAIS (PULMÃO, BAÇO E FÍGADO) EM CAMUNDONGOS COM PLEURISIA

O efeito produzido pelo Ro5-4864 foi analisado observando-se a organização, alteração morfológica celular e edema. A Figura enumerada (A) representa a análise histológica dos tecidos de camundongos tratados somente com solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e a Figura B, animais tratados com Cg (1%/cav.).

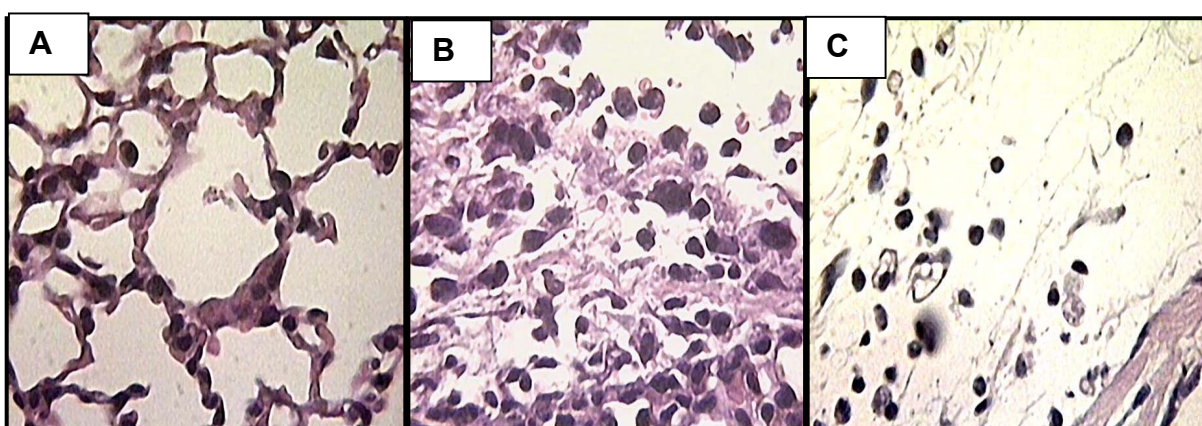
O Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), 0,5 h antes da carragenina, na primeira fase (4 h) da pleurisia, diminuiu significativamente o edema, bem como o número de neutrófilos e mononucleares no pulmão (grau 3 para grau 1) ( $P < 0,01$ ) (Figura 39 C), quando comparamos com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 39 B).





**Figura 39** – Análise comparativa de cortes histológicos do pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização no baço.

Na avaliação do pulmão na segunda (48 h) fase da pleurisia, observamos que o tratamento dos animais com Ro5-4864, administrado em duas doses de 0,1 mg/Kg, i.p., com intervalo de 12 h, diminuiu de forma significativa o número de neutrófilos (grau 2 para 0), de mononucleares (grau 3 para 2), bem como a hiperplasia de macrófagos (grau 1 para grau 0) ( $P < 0,01$ ) (Figura 40 C), ao compararmos com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 40 B).

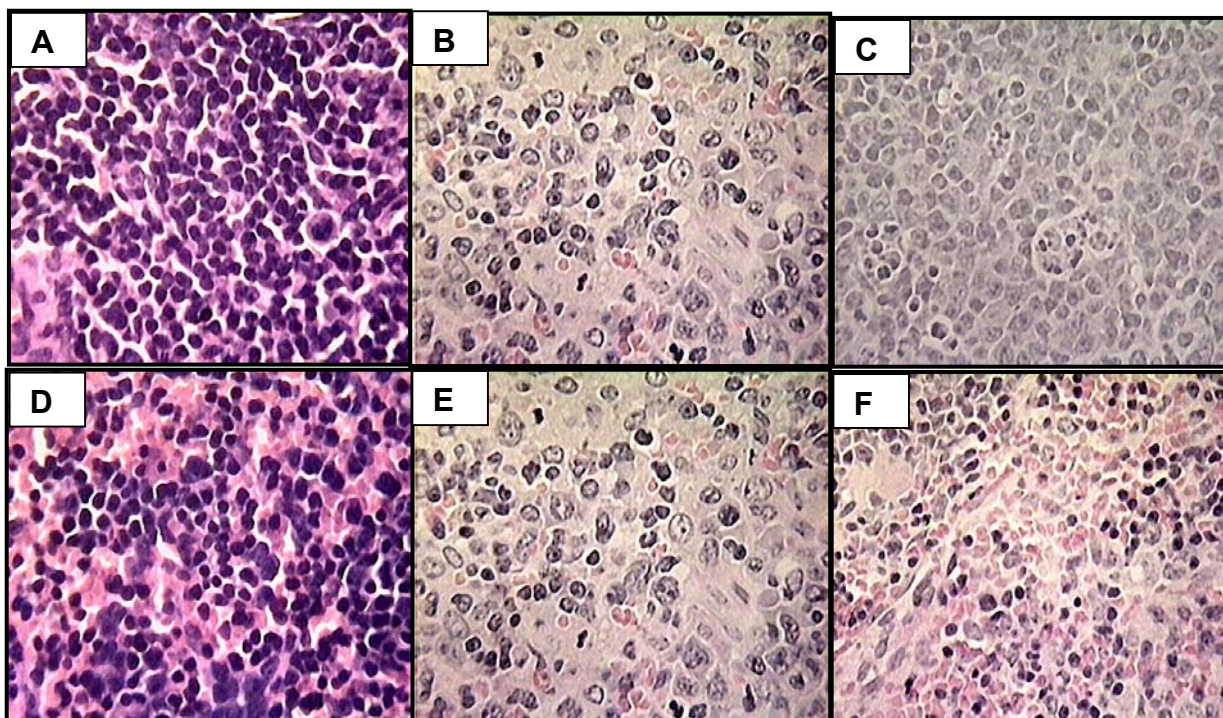


**Figura 40** – Análise comparativa de cortes histológicos do pulmão de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, sobre a infiltração e a organização no pulmão.

No baço, as Figuras enumeradas (A e D) representam a análise histológica dos tecidos de camundongos tratados somente com solução fisiológica (NaCl, 0,9%), nas polpas branca e vermelha, respectivamente. As Figuras B e E, representam os animais tratados com Cg (1%/cav.).

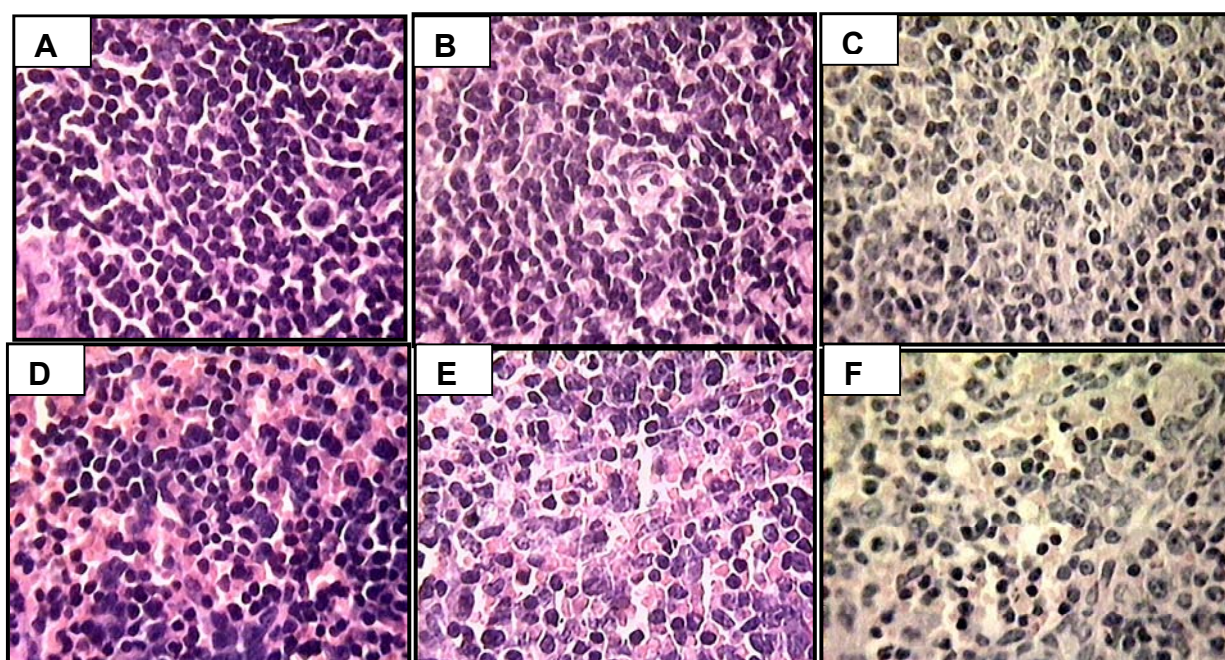
O Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da Cg, na primeira (4 h) fase da resposta inflamatória, diminuiu significativamente a hiperplasia da polpa branca (grau 3 para 1) ( $P < 0,01$ ) (Figura 41 C), além de diminuir significativamente o número de neutrófilos na polpa vermelha (grau 3 para 1) ( $P < 0,01$ ) (Figura 41 F) quando comparamos com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figuras 41 B: polpa branca, 41 E: polpa vermelha).

Ressalta-se que a análise morfológica celular dos animais tratados com este fármaco, observou-se aumento da apoptose na polpa branca (grau 0 para 2) ( $P < 0,01$ ) (Figura 41 C).



**Figura 41** – Análise comparativa de cortes histológicos do baço (polpa branca e vermelha) de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa branca. B - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), na polpa branca. C - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização celular na polpa branca do baço. D - Camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa vermelha. E - Camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), na polpa vermelha. F - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 1 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização celular na polpa vermelha no baço.

Na segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, diminuiu significativamente o centro germinativo da polpa branca (grau 1 para 0) ( $P < 0,01$ ) (Figura 42 C) e o número de mononucleares (grau 3 para 1) e de neutrófilos, na polpa vermelha (grau 2 para 1) ( $P < 0,01$ ) (Figura 42 F), quando comparamos com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figuras 42 B: polpa branca e 42 F: polpa vermelha).

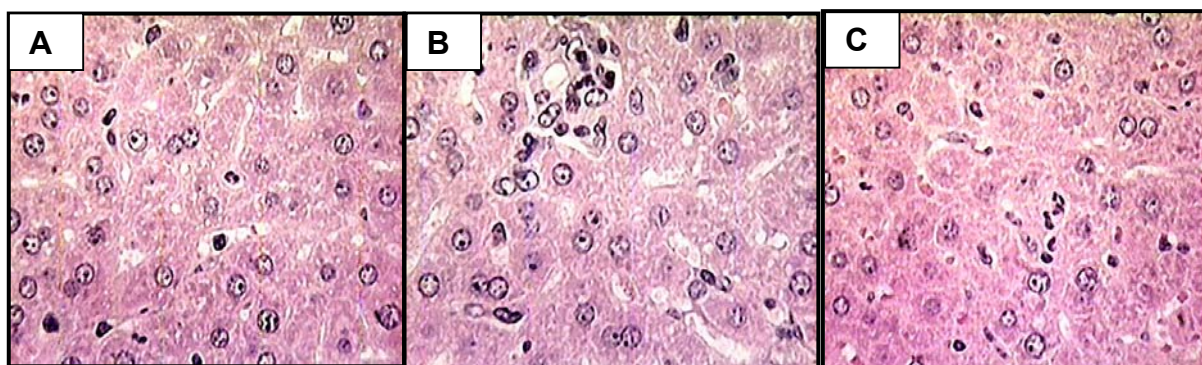


**Figura 42** – Análise comparativa de cortes histológicos do baço de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa branca. B - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), polpa vermelha. C - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), polpa branca. D - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.), polpa vermelha. E - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, na polpa branca. F - Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, na polpa vermelha, sobre a infiltração e a organização celular no baço.

No fígado, a Figura enumerada (A) representa a análise histológica dos tecidos de camundongos tratados somente com solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e a Figura B, animais tratados com Cg (1%/cav.).

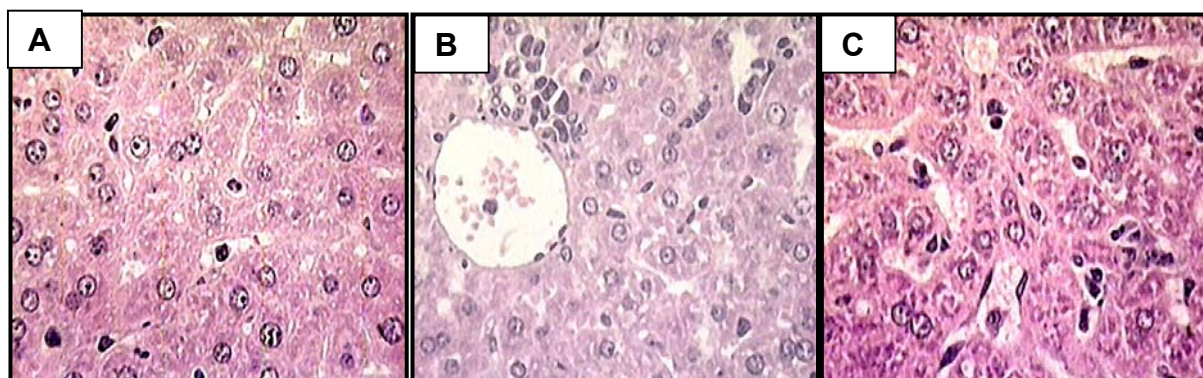
Na primeira (4 h) fase da resposta inflamatória, o Ro5-4864 na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., administrado 0,5 h antes da Cg, não diminuiu significativamente em relação ao padrão inflamatório (células de Kuppfer, neutrófilos) (Figura 43 C) quando

comparamos com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 43 B).



**Figura 43** – Análise comparativa de cortes histológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 4 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). B - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre a infiltração e a organização no fígado.

Avaliando a segunda (48 h) fase da resposta inflamatória, o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes com intervalo de 12 h, foi capaz de inibir significativamente no fígado a hiperplasia de células de Kupffer (grau 2 para 0) ( $P < 0,01$ ), bem como a degeneração hidrópica (grau 1 para 0) ( $P < 0,01$ ) (Figura 44 C) quando comparado com o grupo controle (animais tratados somente com Cg) (Figura 44 B).



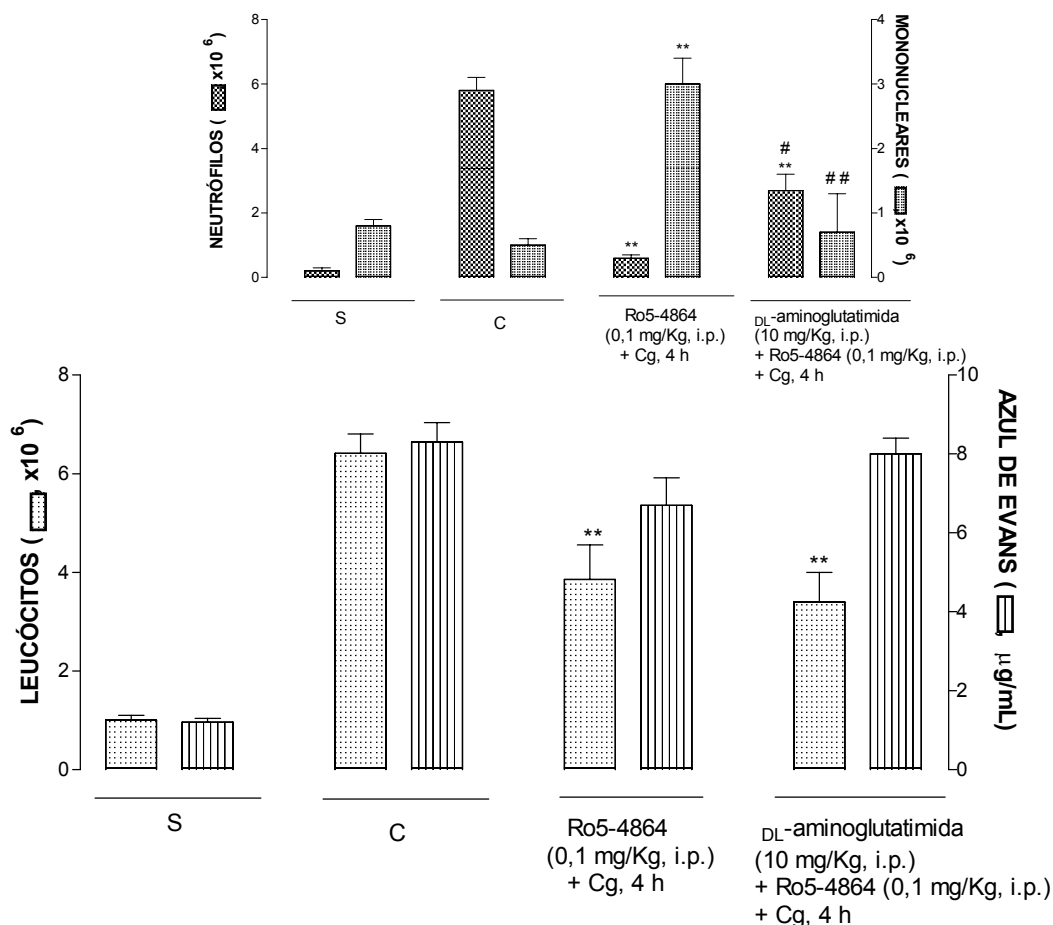
**Figura 44** – Análise comparativa de cortes histológicos do fígado de camundongos, na pleurisia induzida pela carragenina 48 h. A - camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). B - camundongos tratados com carragenina (1%/cav.). C - efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado duas vezes num intervalo de 12 h, sobre a infiltração e a organização no fígado.

#### 5.14 EFEITO DO RO5-4864 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS E A EXSUDAÇÃO NA CAVIDADE PLEURAL DE ANIMAIS TRATADOS COM DL-AMINOGLUTATIMIDA NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

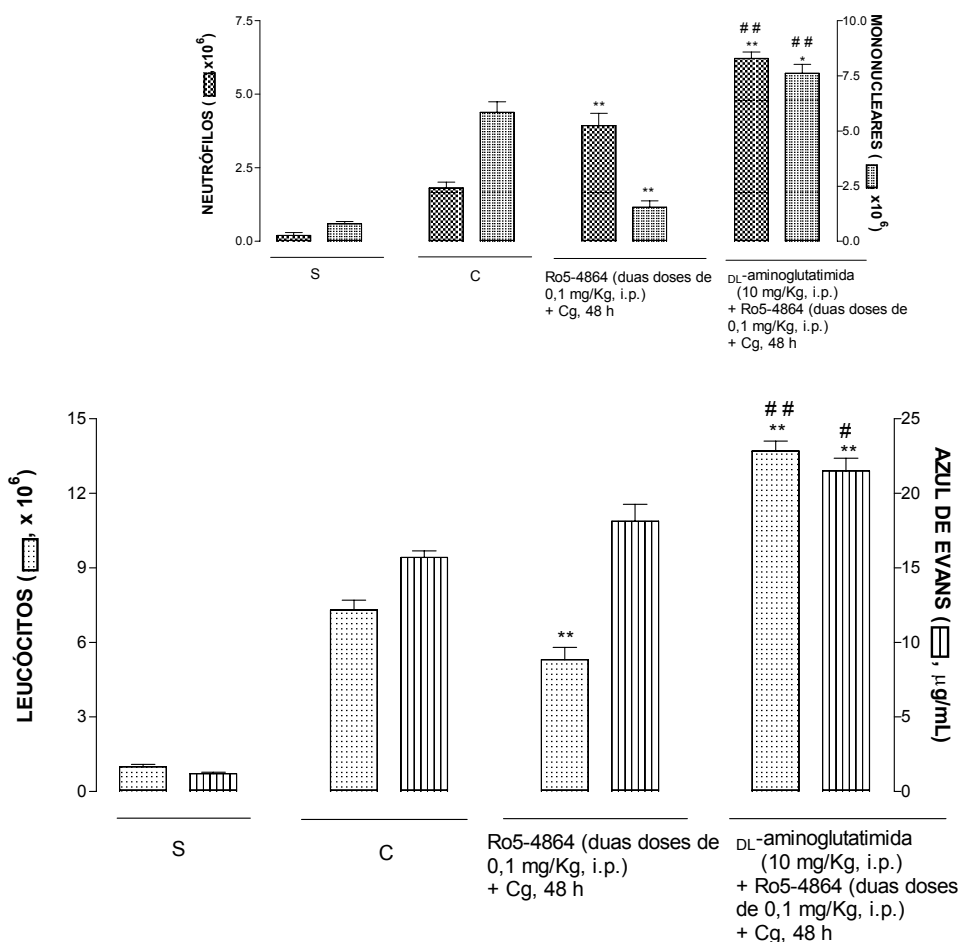
Como mostra a Figura 38, o tratamento dos camundongos com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) mais o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), inibiu significativamente o influxo de leucócitos ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $6,4 \pm 0,5$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $3,4 \pm 0,6$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 45), às custas de neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 4 h:  $5,8 \pm 0,4$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $2,7 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 45, *inset*) na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina. Além disso, se compararmos os grupos de animais com pleurisia tratados com DL-aminoglutatimida + Ro5-4864 daqueles tratados somente com Ro5-4864 foi observado que houve uma reversão do efeito com aumento de neutrófilos e uma diminuição de mononucleares ( $P < 0,05$ ) (Figura 45, *inset*).

Na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, no grupo de animais tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) e Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.) observou-se um aumento significativo dos parâmetros inflamatórios: leucócitos totais ( $\times 10^6$ ) (S:  $1,0 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $7,3 \pm 0,4$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $13,7 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 46), neutrófilos ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $1,8 \pm 0,1$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $6,2 \pm 0,2$ ) e mononucleares ( $\times 10^6$ ) (S:  $0,8 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $5,5 \pm 0,3$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $7,6 \pm 0,4$ ) (Figura 46, *inset*), além da concentração de azul de Evans ( $\mu\text{g/mL}$ ) (S:  $1,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $15,7 \pm 0,4$ , DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $21,5 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 46). Nesta fase, no grupo de animais tratados com DL-aminoglutatimida e Ro5-4864 ocorreu uma inversão dos

parâmetros inflamatórios (leucócitos totais, neutrófilos, mononucleares e exsudação) ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo de animais tratados somente com Ro5-4864 (Figuras 46 e 46 inset).



**Figura 45** – Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 0,5 h antes) sobre os níveis de leucócitos e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos tratados previamente com dL-aminoglutimida (10 mg/Kg, i.p.). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \*\*  $P < 0,01$  – Cg vs Ro5-4864; Cg vs DL-aminoglutimida + Ro5-4864 e #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$  – Ro5-4864 vs DL-aminoglutimida + Ro5-4864.



**Figura 46** – Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de leucócitos e a exsudação de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 – Cg vs Ro5-4864; Cg vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864 e # P < 0,05; ## P < 0,01 – Ro54864 vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864.

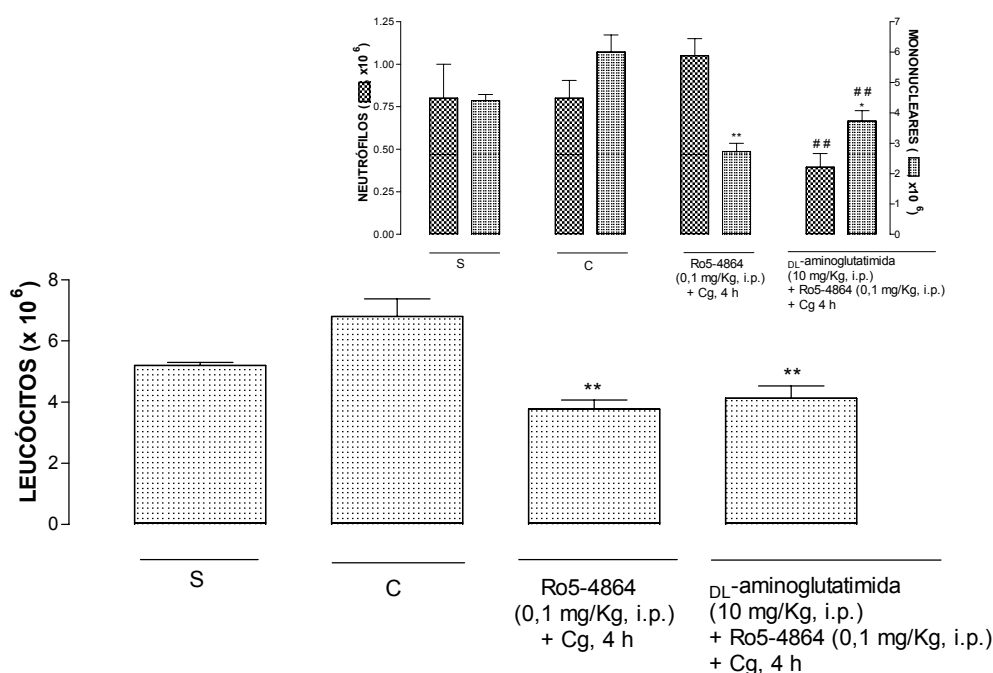
### 5.15 EFEITO DO RO5-4864 SOBRE OS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS NO SANGUE DE ANIMAIS TRATADOS COM DL-AMINOGLUTATIMIDA NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA 4 E 48 H

Avaliando-se o efeito do Ro5-4864 nos grupos de animais tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.), observa-se uma diminuição no número de leucócitos (x10<sup>6</sup>) (S: 5,2±0,1; Cg 4 h: 6,8±0,6; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864: 4,1±0,4) (P < 0,01) (Figura 47), às custas de neutrófilos (S: 0,8±0,2; Cg 4

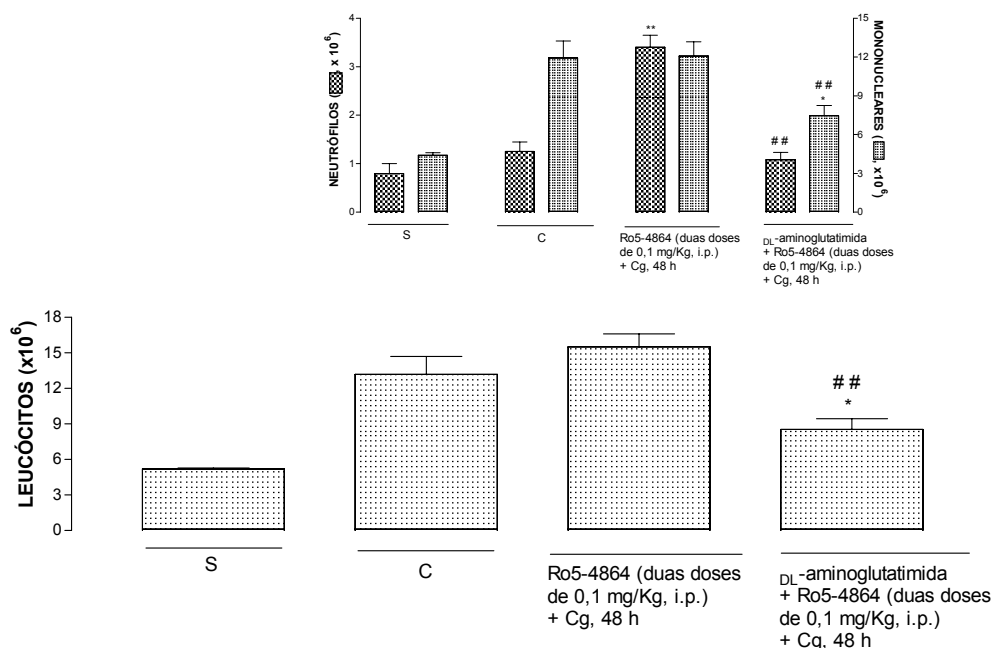
h:  $0,8 \pm 0,1$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $0,4 \pm 0,1$ ) e de mononucleares (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 4 h:  $6,0 \pm 0,5$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $3,7 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 47, *inset*) na primeira fase (4 h) da pleurisia. Observamos que no grupo de animais tratados com DL-aminoglutatimida, uma diminuição no número de neutrófilos ( $P < 0,01$ ), porém um aumento no número dos mononucleares em relação ao grupo de animais tratados somente com Ro5-4864 ( $P < 0,01$ ) (Figura 47, *inset*).

Na segunda fase (48 h), nos animais tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) e Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), observou-se também uma diminuição dos leucócitos (S:  $5,2 \pm 0,1$ ; Cg 48 h:  $14,9 \pm 1,0$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $8,5 \pm 0,9$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 48), às custas de mononucleares (S:  $4,4 \pm 0,2$ ; Cg 48 h:  $13,7 \pm 1,0$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $7,4 \pm 0,8$ ) (Figura 48, *inset*). Se compararmos os grupos: animais tratados com DL-aminoglutatimida e Ro5-4864 e aqueles tratados somente com Ro5-4864, observa-se que o primeiro grupo promoveu uma diminuição significativa de leucócitos totais e de neutrófilos ( $P < 0,01$ ) em relação ao segundo grupo ( $P < 0,01$ ) (Figura 48, *inset*).





**Figura 47** – Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre os leucócitos. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 – Cg vs Ro5-4864; Cg vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864 e ## P < 0,01 – Ro5-4864 vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864.



**Figura 48** – Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 horas. S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 – Cg vs Ro5-4864; Cg vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864 e ## P < 0,01 – Ro5-4864 vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864.

### 5.16 EFEITO DO RO5-4864 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DA MIELOPEROXIDASE, DA ADENOSINA-DEAMINASE E DE NITRITO/NITRATO (NO<sup>x</sup>), EM ANIMAIS TRATADOS COM DL-AMINOGLUTATIMIDA NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS, 4 E 48 H

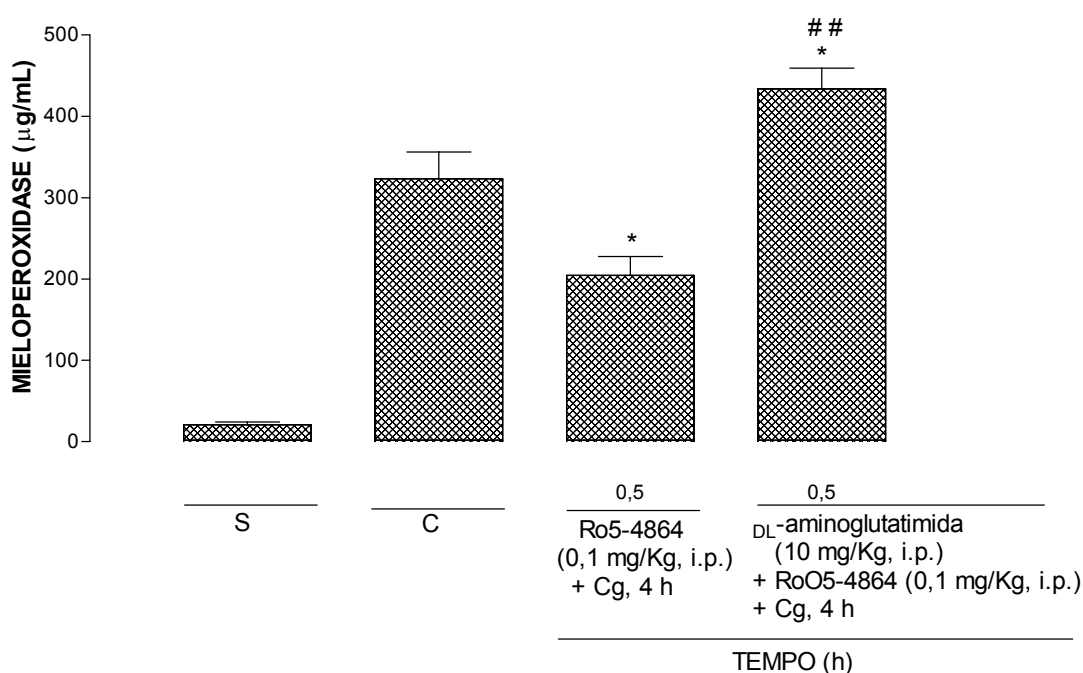
O Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), inibiu os níveis de mieloperoxidase apenas quando tratado 0,5 h antes da carragenina, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória.

Como demonstra a figura 49, observamos que em camundongos tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) mais Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), 0,5 h antes da carragenina, houve uma reversão nos níveis da mieloperoxidase, quando comparado com grupo de animais tratados somente com o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., 0,5 h antes da carragenina) ( $\mu\text{M}$ ) (S:  $21,0 \pm 3,2$ ; C:  $329,3 \pm 33$ ; Ro5-4864:  $204,3 \pm 23,3$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $433,5 \pm 25,3$ ) ( $P < 0,01$ ).

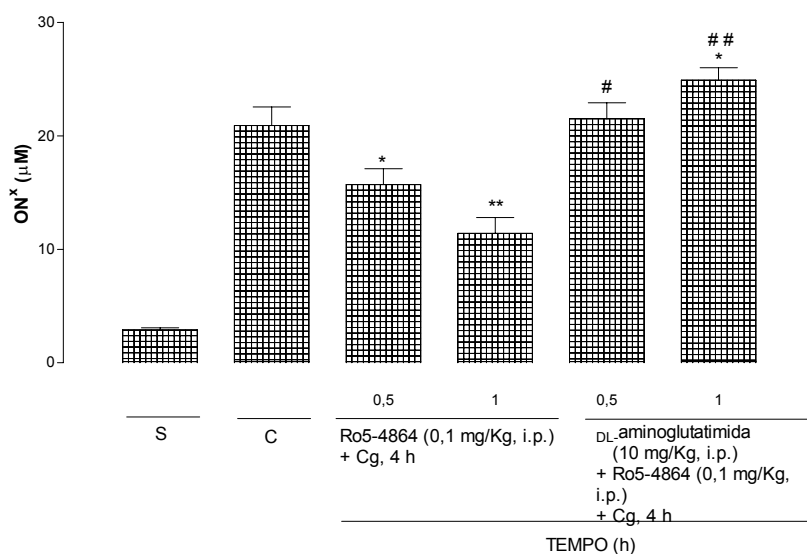
Além disso, o Ro5-4864, na dose de 0,1 mg/Kg, i.p., foi capaz de inibir os níveis de óxido nítrico (NO<sup>x</sup>) quando administrado 0,5 e 1 h antes da Cg. O tratamento dos camundongos com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) mais Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), demonstrou que em ambos os pré-tratamentos (0,5 e 1 h) reverteram significativamente os níveis do óxido nítrico em relação aos grupos de animais tratados somente com o Ro5-4864 ( $\mu\text{M}$ ) (S:  $2,9 \pm 0,1$ ; C:  $20,9 \pm 1,6$ ; Ro5-4864: 0,5 h:  $15,7 \pm 1,4$ ; 1 h:  $11,4 \pm 1,4$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864: 0,5 h:  $21,5 \pm 1,4$ ; 1 h:  $24,9 \pm 1,1$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 50).

Na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, o Ro5-4864 foi eficaz em inibir somente os níveis de adenosina-deaminase. Como demonstra a figura 51, animais tratados com DL-aminoglutatimida (10 mg/Kg, i.p.) mais Ro5-4864 (0,1

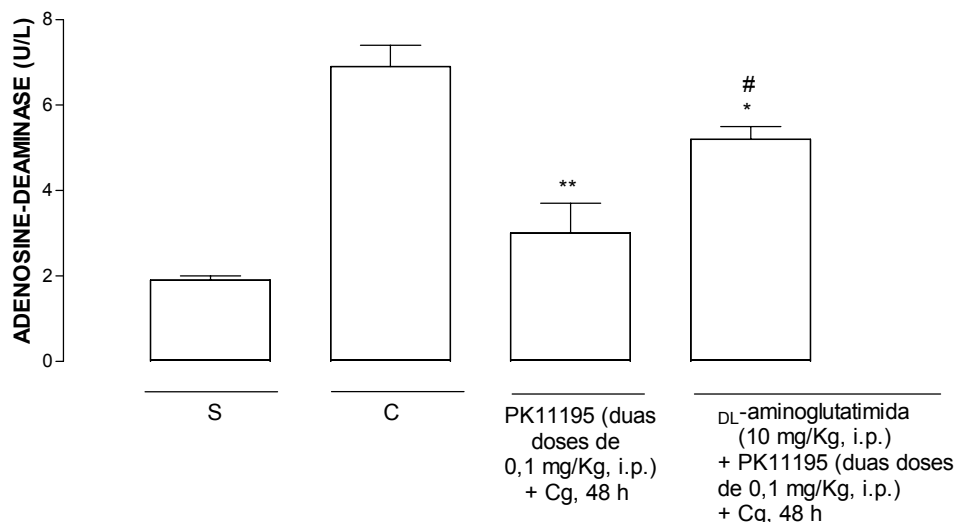
mg/Kg, i.p., duas doses num intervalo de 12 h), reverteu de forma significativa os níveis de adenosina deaminase (U/L) quando comparado com grupo de animais tratados somente com o Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p., duas doses num intervalo de 12 h) (S:  $1,9 \pm 0,1$ ; C:  $6,9 \pm 0,5$ ; Ro5-4864:  $3,0 \pm 0,7$ ; DL-aminoglutatimida + Ro5-4864:  $5,2 \pm 0,3$ ) ( $P < 0,05$ ).



**Figura 49** - Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis da mieloperoxidase em camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 0,5 h antes da carragenina, sobre os níveis da mieloperoxidase (μg/mL). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a mieloperoxidase. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \*  $P < 0,05$  – Cg vs Ro5-4864; ## Ro5-4864 vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864.



**Figura 50** - Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de nitrato/nitrito (ON<sup>x</sup>) em camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado 0,5 e 1 h antes da carragenina, sobre os níveis de nitrato/nitrito (µM). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 4 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre nitrato/nitrito (ON). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 – Cg vs Ro5-4864; # P < 0,05 e ## P < 0,01- Ro5-4864 vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864.



**Figura 51** - Efeito do Ro5-4864, sobre os níveis de adenosina-deaminase em camundongos tratados previamente com DL-aminoglutatimida na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Efeito do Ro5-4864 (0,1 mg/Kg, i.p.), administrado em duas doses num intervalo de 12 h, sobre os níveis de adenosina-deaminase (U/L). S = respostas obtidas de animais tratados somente com solução salina estéril (NaCl, 0,9%). C = respostas obtidas de animais tratados somente com carragenina (Cg 1%, 48 h). As inserções mostram os efeitos deste fármaco sobre a adenosina-deaminase. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 4-6 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 – Cg vs PK11195; # P < 0,05 - Ro5-4864 vs DL-aminoglutatimida + Ro5-4864.

## 6 DISCUSSÃO

O modelo da pleurisia induzida pela carragenina é um modelo de resposta inflamatória do tipo bifásico caracterizado pelo aumento da exsudação e de leucócitos do tipo neutrófilos 4 h após a administração da Cg na cavidade pleural de camundongos. Esta fase é reconhecida como fase inicial ou recente. Outra fase ocorre 48 h após a indução da pleurisia pela Cg e é caracterizada pelo aumento da exsudação e do número de leucócitos do tipo mononucleares. Estas duas fases foram utilizadas para a análise dos efeitos antiinflamatórios dos fármacos PK11195 e do Ro5-4864.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os ligantes do receptor benzodiazepínico periférico: PK11195 e Ro5-4864 exerceram um efeito inibitório na resposta inflamatória, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Assim, estes resultados vêm corroborar estudos anteriores, nos quais os fármacos PK11195 e Ro-4864 apresentaram importantes propriedades antiinflamatórias (TORRES et al., 1999, 2000).

Em nossos experimentos, ambos os fármacos estudados, PK11195 e Ro5-4864, demonstraram ser efetivo em inibir a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos para a cavidade pleural, na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Além da migração celular, o Ro5-4864 ainda foi capaz de inibir as concentrações da mieloperoxidase. Estudos realizados por FRODE; MEDEIROS, 2001, demonstraram a participação desta enzima no modelo inflamatório da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Esta enzima, que está localizada principalmente nos grânulos azurófilos de neutrófilos caracteriza a ativação celular uma vez que é liberada

quando estas células estão ativadas (GASSER et al., 2003; WALRAND et al., 2003). A mieloperoxidase, quando liberada, participa da indução do metabolismo respiratório, evento este importante na fagocitose de microorganismos invasores, como por exemplo: bactérias, vírus e fungos (KLEBANOFF, 1999), bem como células tumorais (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000). Estes resultados iniciais, portanto, indicam que um dos mecanismos de ação antiinflamatória do Ro5-4564 deve-se a inibição de células ativadas do tipo neutrófilos, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos.

Em relação à segunda (48 h) fase desta resposta inflamatória, ambos os fármacos inibiram a migração de leucócitos, do tipo mononucleares. Além disso, nesta fase, tanto o PK11195 como o Ro5-4864, inibiram também as concentrações da enzima adenosina-deaminase. Estudos têm demonstrado que a adenosina-deaminase (ADA) é uma enzima liberada de linfócitos ativados (BLACKBURN; DATTA; KELLEMS, 1998) e tem sido observado o aumento da atividade desta enzima em várias doenças pelo qual ocorre a ativação da resposta imune celular, como por exemplo: em pacientes com artrite reumática (SARI et al., 2003), leishmaniose (EREL et al., 1998), lupus eritematoso sistêmico (HITOGLOU et al., 2001), portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (SATHAR et al., 1999), tuberculose (DIACON et al., 2003) e brucelose (DIKENSOY et al., 2002). Além disso, esta enzima está envolvida no metabolismo das purinas sendo capaz de regular os níveis plasmáticos da adenosina, um poderoso autacóide antiinflamatório (YONEYAMA et al., 2002; MABLEY et al., 2003). Estudos em modelos animais demonstraram que o autacóide adenosina também está envolvido em doenças inflamatórias como, por exemplo, choque séptico (HASKO et al., 1998), artrite

reumatóide (SZABO et al., 1998), inflamação pleural (SCHRIER et al., 1990), uveíte (MARAK et al., 1988), entre outros. Os efeitos observados pela adenosina são amplos, pleiotrópicos e dependentes da ativação dos diferentes tipos de receptores. Os receptores para a adenosina que já foram caracterizados farmacologicamente podem ser enumerados em:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$  (FREDHOLM et al., 2001, LINDEN, 2001). Estudos realizados em camundongos *knockout* para o receptor  $A_1$ , bem como a utilização de agonista para este receptor (CCPA), demonstraram uma significativa redução na atividade da mieloperoxidase, na infiltração de neutrófilos bem como a diminuição na expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-1 e de citocinas do tipo TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ , em modelo de isquemia e reperfusão, nos rins de camundongos. Além disso, neste experimento, foi demonstrado que o antagonista para o receptor  $A_1$  (DPCPX), reverteu os efeitos antiinflamatórios mencionados anteriormente (LEE et al., 2003). Em relação aos receptores  $A_{2A}$ , estudos revelaram que a administração de agonista seletivo para este receptor (CGS 21680), inibiu de forma dose-dependente o número de leucócitos, as concentrações de proteínas totais, a atividade da mieloperoxidase e da peroxidase, no lavado broncoalveolar, no modelo de inflamação alérgica pulmonar induzido pela ovalbumina, em ratos (FOZARD et al., 2002).

Os efeitos antiinflamatórios da ativação do receptor  $A_3$  também já foram demonstrados com a utilização de agonista deste receptor (IB-MECA), no modelo de inflamação intestinal induzido pelo dextran, em camundongos (MABLEY et al., 2003). Neste estudo, o IB-MECA reduziu de forma significativa a infiltração de leucócitos para o intestino e diminuiu o metabolismo oxidativo de células ativadas. Além disso, neste mesmo modelo experimental, foi observado que o IB-MECA,

aumentou o peso e reduziu o sangramento pelas fezes de camundongos com colite (MABLEY et al., 2003).

Nos nossos resultados demonstramos que tanto o PK11195 como o Ro5-4864 inibiram a ADA. Este fato denota que a inibição dos leucócitos na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, pode estar relacionada a inibição de linfócitos ativados liberados na inflamação causada por este agente flogístico na cavidade pleural de camundongos.

Uma vez que os fármacos PK11195 e Ro5-4864 foram capazes de inibir a migração leucocitária na cavidade pleural em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, e em virtude desta inflamação apresentar um caráter sistêmico, o próximo passo foi verificar, em nível histológico, se estes fármacos estariam inibindo a quimiotaxia destas células ativadas da cavidade pleural de camundongos inflamados para os tecidos. Desta forma, utilizou-se a metodologia da histologia para estudar este possível efeito.

Neste protocolo experimental, tanto o PK11195 quanto o Ro5-4864 inibiram a migração celular tecidual, diminuindo a migração de leucócitos do tipo neutrófilos e de mononucleares, bem como a hiperplasia de macrófagos, no pulmão. Estes fármacos também diminuíram de forma significativa a migração de neutrófilos e de mononucleares, no baço. É importante ressaltar que neste último tecido, os fármacos, em estudo, induziram a apoptose na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o PK11195 é capaz de aumentar a apoptose celular induzida por diferentes estímulos: lesão do ADN, ativação do receptor glicocorticóide e ceramida, em diferentes células, como: tímócito, células T de leucemia aguda (CEM-C7), células T híbridas (2B4. 11) e células B leucêmicas



(WEH231) (HIRSCH et al., 1998). Além disso, ambos os fármacos foram capazes de diminuir a hiperplasia de células de Küppfer, no fígado, sendo que o PK11195 também foi eficaz de inibir a migração de neutrófilos neste último órgão.

Uma das hipóteses para explicarmos a diminuição da celularidade na cavidade pleural nos tecidos inflamados, pode ser devido a inibição da expressão de moléculas de adesão. Sabe-se que as moléculas de adesão estão envolvidas diretamente na inflamação, pois medeiam o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão (MASON; DAVIES; JIANG, 2002).

Conhecem-se pelo menos três famílias de moléculas de adesão: as selectinas, as integrinas e a super família das imunoglobulinas. As selectinas são moléculas importantes que participam principalmente no rolamento dos leucócitos durante a inflamação. A ativação destas moléculas durante a resposta inflamatória depende principalmente do tipo de estímulo e do tempo de duração da resposta inflamatória (KEVIL, 2003). Dentre as principais selectinas destacam-se as: E-selectinas, presentes no endotélio, as P-selectinas, nas plaquetas e leucócitos e a L-selectina, presente nos leucócitos. Estudos realizados por SINGBARTL; GREEN; LEY, 2000 demonstraram que animais *knockout* para a molécula de adesão P-selectina, apresentaram uma diminuição da atividade da MPO indicando indiretamente uma inibição no influxo de neutrófilos, no modelo de falência renal induzida pela isquemia/reperfusão, em camundongos (C57BL/6). Verificou-se também, neste mesmo modelo experimental a diminuição nos níveis de creatinina e uréia, indicando uma diminuição da falência renal nos animais *knockout* para P-selectinas quando comparados com o grupo controle (camundongos inflamados). Estes autores também demonstram que a molécula de adesão P-selectina é

importante na migração de leucócitos neste modelo experimental. Outros estudos, realizados por JONES et al., 2000, utilizando camundongos (C57BL/6) *knockout* para a molécula de adesão E-selectina, demonstraram uma diminuição do influxo de neutrófilos para o miocárdio, no modelo de lesão do miocárdio por isquemia e reperfusão. Com relação a L-selectina, YADAV et al., 1998, utilizando o modelo experimental de isquemia e reperfusão no fígado de camundongos, observaram que em camundongos *knockout* para L-selectina observou-se uma diminuição significativa da infiltração de leucócitos do tipo neutrófilos, além de prevenir a falência microvascular e diminuir os níveis de aspartato-aminotransferase (AST), quando comparado ao grupo controle.

Outras moléculas de adesão também importantes na resposta inflamatória e cuja principal função é a transmigração celular são as integrinas. Pesquisas utilizando diferentes modelos experimentais demonstraram a importância das moléculas de adesão em processos inflamatórios envolvendo o complexo CD11a/CD18, também denominado de LFA-1, que é uma integrina da classe  $\beta 2$ , expressa em todos os leucócitos (CARMAN et al., 2003). Após o estímulo induzido por citocinas pró-inflamatórias ou por ativação do fator de transcrição nuclear NF-kappaB, as moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais adquirem alta afinidade pelo seu ligante (TURUTIN et al., 2003). A partir deste evento, em conjunto com a liberação de fatores quimiotáticos, ocorre a ligação firme entre os leucócitos e o endotélio, permitindo, assim, a migração celular (HAN et al., 2001; TACHIMOTO; EBISAWA; BOCHNER, 2002). Este é o papel das integrinas, pelo qual fazem a transmigração celular do sangue para os tecidos.

A família de moléculas de adesão do tipo superfamília das imunoglobulinas apresenta também importância na adesão e na transmigração leucocitária. Dentre as proteínas desta família que estão envolvidas na migração celular, citam-se a molécula de adesão intercelular – 1 (ICAM-1), expressa tanto em leucócitos quanto em células endoteliais (KEVIL, 2003). Após a ligação inicial entre os leucócitos e as células endoteliais ocorre uma ligação entre a ICAM-1 e a  $\beta$ 2-integrina, proporcionando a transmigração de leucócitos através do endotélio vascular (HUBBARD; ROTHLEIN, 2000). Na verdade, ainda não sabemos em qual etapa estes fármacos são capazes de inibir a expressão de moléculas de adesão. Além disso, a inibição pode ocorrer em uma ou outra ou até mesmo na expressão de várias moléculas de adesão. Portanto, podemos hipotetizar que no modelo experimental estudado, um dos mecanismos para que os fármacos tenham inibido a quimiotaxia celular da cavidade pleural para os tecidos seja via inibição da expressão de moléculas de adesão.

Outro resultado importante observado na histologia foi o efeito dos ligantes do RBP na indução da apoptose celular. Estudos revelam que a apoptose é um importante mecanismo de defesa na resposta inflamatória (GILROY et al., 2003). Os nossos resultados, portanto, estão de acordo com estudos pela qual têm demonstrado que o ligante do receptor benzodiazepínico, PK11195 induziu o aumento da apoptose por diferentes estímulos, incluindo lesão do ADN, ativação dos receptores glicocorticóides e utilização de um segundo mensageiro proapoptótico (ceramida) em: timócitos, células T de leucemia aguda (CEM-C7), células T híbridas (2B4.11) e células B leucêmica (WEHI231) (HIRSCH et al., 1998). Vários mecanismos de ação antiinflamatória para os ligantes do RPB são propostos. Na

verdade, estudos adicionais são necessários para esclarecer o verdadeiro mecanismo de inibição dos fármacos em estudo, PK11195 e Ro5-4864 principalmente sobre a quimiotaxia de leucócitos.

Na avaliação do efeito do PK11195 e do Ro5-4864 sobre a exsudação, na cavidade pleural e nos tecidos dos animais tratados com carragenina, verificamos novamente o efeito antiinflamatório destes fármacos. Em nossos experimentos, ambos os fármacos também foram capazes de inibir os níveis de exsudação tanto na cavidade pleural como no pulmão, na primeira (4 h) fase da pleurisia, induzida pela carragenina. Este efeito anti-edematogênico pode ser explicado provavelmente devido a uma possível ação dos fármacos sobre mediadores, liberados e/ou formados nesta fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, relacionados a exsudação e/ou aumento da permeabilidade vascular (GREIFF et al., 1998; EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD; THURSTON; BALUK, 1999). Dentre os principais mediadores envolvidos na inflamação e relacionados com a exsudação, podemos citar: óxido nítrico, bradicinina e também a histamina.

Estudos têm demonstrado que durante a inflamação, citocinas pró-inflamatórias, dentre elas: IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  podem estimular a liberação de óxido nítrico através da ONSi presentes em células endoteliais, da musculatura lisa, macrófagos, dentre outras células (MATSUDA et al., 2003). O ON tem sido implicado em diversos processos fisiológicos e patológicos como: vasodilatação, lesão tecidual, inflamação aguda ou crônica (SALERNO et al., 2002). Estudos também tem demonstrado a participação do óxido nítrico em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongo (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999). Em nossos experimentos, o PK11195 e o Ro5-4864 inibiram tanto a exsudação como os níveis

de ON<sup>x</sup> no lavado pleural de camundongos com pleurisia. Estes nossos resultados, portanto estão de acordo com a literatura uma vez que estudos têm revelado a relação direta do óxido nítrico com a exsudação (CUZZOCREA et al., 2000). Estes autores demonstraram, uma diminuição dos níveis de exsudato e de nitrato/nitrito, em animais deficientes da enzima ONSi, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em ratos.

Outra hipótese para o efeito anti-edematogênico tanto do PK11195 como do Ro5-4864 é a inibição do mediador pró-inflamatório, denominado bradicinina. Em relação a bradicinina, sabe-se que o receptor B<sub>2</sub> da bradicinina é expresso constitutivamente em vários tecidos. Além disso, a maioria dos efeitos pró-inflamatórios da bradicinina é mediada por este receptor, como por exemplo, a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (KAPLAN et al., 1998). Estudos também revelam que este mediador pró-inflamatório estimula, *in vitro*, a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1, IL-2 e IL-6 e este efeito é revertido com a utilização de antagonistas seletivos para o receptor B<sub>2</sub> da bradicinina (HOE 140) (PAEGELOW; WERNER; REISSMANN, 1995). Outros trabalhos realizados por HAYASHI et al., 2000 também demonstraram que a bradicinina induz a síntese de IL-6 e IL-8, via ativação do receptor B<sub>2</sub> da bradicinina, localizada em fibroblastos humanos. No modelo da pleurisia induzida pela carragenina, a utilização do antagonista seletivo para o receptor B<sub>2</sub> da bradicinina (NPC18884) diminuiu a exsudação na cavidade pleural de camundongos com pleurisia (SALEH et al., 1998). Este efeito pode ser devido à inibição de citocinas pró-inflamatórias, liberadas pela bradicinina, como por exemplo: IL-1 e IL-6 (MARUO et al., 1992; MAJIMA, et al., 1997; MODEER; ANDUREN; YUCEL-LINDBERG, 1998). Além disso, trabalhos têm

sido descritos informando que a bradicinina é capaz de estimular a síntese de citocinas, através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, e estas citocinas são inibidas pelos corticosteróides (PAN et al., 1998; HUANG et al., 2003, ZHU et al., 2003).

A histamina é também um importante mediador envolvido em condições tanto fisiológica quanto patológica, incluindo neurotransmissão, secreção de hormônios pituitários, regulação da função gastrointestinal e circulatória. A histamina também está envolvida nas doenças inflamatórias, como por exemplo, asma e rinite alérgica (JUTEL et al., 2002; AKDIS; BLASER, 2003). Sabe-se que a histamina é armazenada nos grânulos celulares e que as maiores fontes deste mediador são os basófilos e os mastócitos. Além disso, os efeitos farmacológicos da histamina são mediados através da ativação de quatro tipos de receptores: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> (SCHNEIDER; ROLLI-DERKINDEREN; AROCK, 2002). A maioria dos sintomas agudos em doenças inflamatórias como, urticária, rinite alérgica e asma alérgica são resultados da liberação rápida da histamina no endotélio vascular, nos brônquios e também nas células da musculatura lisa. Acredita-se que os efeitos produzidos pela ação da histamina, na fase imediata da reação alérgica, como: vasodilatação, contração da musculatura lisa, hipersecreção de muco e edema, é mediado pela interação da histamina com o receptor H<sub>1</sub> (GELDFAND et al., 2002; SIMONS 2002).

Assim, podemos supor que a inibição da exsudação pelos ligantes do RBP pode ser via inibição de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, o óxido nítrico, a bradicinina e a histamina, dentre outros.

Este efeito antiinflamatório dos fármacos estudados tanto em relação a inibição da celularidade como da exsudação, pode ser atribuído, de forma geral à

síntese esteroidal. Esta hipótese deve-se ao fato que em nossos experimentos utilizando a DL-aminoglutatimida, observamos que este fármaco reverteu os efeitos antiinflamatórios tanto do PK11195 quanto do Ro5-4864, sobre a migração celular e exsudação, sendo este efeito mais pronunciado na segunda fase (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Este fato demonstra um efeito antiinflamatório importante dos fármacos em estudo e este efeito, portanto, poderia ser atribuída ao aumento da síntese de corticóides pela adrenal ou outras células capazes da produção de esteróides. Neste sentido, estudos demonstram que a ativação do receptor benzodiazepínico periférico induz um aumento na síntese de esteróides, característica esta bem documentada não somente nos tecidos esteroigênicos, como por exemplo: na placenta (BARNEA; FARES; GAVISH, 1989), na adrenal (BESMAN et al., 1989), no testículo (PAPADOPOULOS et al., 1990) e nas células ovarianas (AMSTERDAM; SUH, 1991) como também nas células de Schwann e na glia (PAPADOPOULOS et al., 1992; LACOR et al., 1999). Outros estudos demonstraram que o diazepam, considerado um ligante do receptor benzodiazepínico periférico, aumentou os níveis de corticosterona, em ratos (LAZZARINI et al., 2003). O mecanismo de ação está baseado no fato que os ligantes do receptor benzodiazepínico periférico estimulam a síntese de esteróides aumentando a translocação do colesterol de fora para dentro da membrana mitocôndrial, passo este inicial na esteroiogênese (PAPADOPOULOS; BERKOVICH; KRUEGER, 1991).

Partindo-se da suposição que o principal mecanismo antiinflamatório dos ligantes do RBP (PK11195 e Ro5-4864) é devido ao aumento da síntese esteroidal durante a resposta inflamatória, devemos pelo menos comentar de forma geral o

mecanismo de ação, já bem documentado, dos glicocorticóides. De modo geral, os glicocorticóides exercem seus efeitos através da ligação específica com um receptor intracelular, denominado de receptor glicocorticóide (GR). Estas interações desencadeiam a ativação de elementos relacionados a genes, denominadas de elementos de resposta aos glicocorticóides (GRE), modulando a estimulação ou a inibição da transcrição gênica (PELAIA et al., 2003). Exemplos da estimulação da transcrição protéica podem ser exemplificados: a lipocortina-1 liberada sistemicamente induz a inativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> e esta inibe a liberação de mediadores lipídicos (PAF, leucotrienos e prostaglandinas), além de citocinas do tipo antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) e IL-10, que são conhecidas por suas propriedades antiinflamatórias (BARNES; PEDERSEN; BUSSE, 1998, ADCOCK; ITO, 2000). Além da estimulação da transcrição protéica, os glicocorticóides são capazes de aumentar a síntese da I $\kappa$ B, importante fator endógeno, que inibe a ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (BARNES; ADCOCK, 1997; MCKAY, CIDLOWSKI, 1999).

Exemplos de inibição da transcrição protéica podem também ser enumerada: inibição da liberação de citocinas do tipo pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF), quimocinas (IL-8, RANTES, MCP-1, MCP-2, eotaxina), enzimas que sintetizam mediadores inflamatórios (ONSi, COX-2 e Fosfolipase A<sub>2</sub>), além de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas) (HANDEL; NGUYEN; LEHMANN, 2000; PELAIA et al., 2003).

Os glicocorticóides exercem também efeito antiinflamatório inibindo enzimas ou citocinas pós-transcrição. Este mecanismo de ação ocorre pela ativação de ribonucleases pela qual reduzem a meia vida de alguns ARNm importantes na



síntese de proteínas como, por exemplo, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*GM-CSF*) e também isoforma induzida da ciclooxigenase (*COX-2*) (BICKEL; COHEN; PLUZNIK, 1990; NEWTON et al., 1998).

Os efeitos antiinflamatórios dos glicocorticoides foram bem estudados e atualmente muitos destes fármacos são utilizados na clínica, como por exemplo, a utilização da budesonida, um fármaco utilizado no tratamento da asma brônquica. Estudos demonstram que este fármaco inibiu a expressão da molécula de adesão ICAM-1 e VCAM-1 após estimulação com IL-1 $\beta$ , em fibroblasto de pacientes asmáticos (SPOELSTRA et al., 2000). LIU et al. (2001), também demonstraram que o tratamento com a prednisona foi efetivo em inibir os níveis de TGF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5 no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos. Da mesma forma, estes autores também verificaram que este fármaco reduziu significativamente os níveis de ARNm de citocinas IL-4 e IL-5 nas células do lavado bronco alveolar de pacientes asmáticos, reforçando a conclusão que os glicocorticóides suprimem a expressão destas citocinas.

Concluindo, os resultados aqui demonstrados revelam que tanto o PK11195 como o Ro5-4864, ambos ligantes do receptor benzodiazepínico periférico, possuem efeitos antiinflamatórios importantes, tanto na migração de leucócitos, como na exsudação e algumas enzimas e mediadores pró-inflamatórios, que são liberadas na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Este efeito, portanto, pode ser principalmente atribuído ao aumento da liberação de corticóides de células capazes de sintetizá-los como, por exemplo, a adrenal. Estudos posteriores devem ser realizados para melhor elucidar o mecanismo de ação

antiinflamatória dos ligantes do receptor benzodiazepínico periférico (PK11195 e Ro5-4864).

## 7 CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos demonstram que: o PK11195 e o Ro5-4864, foram capazes de diminuir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, em ambas as fases (4 e 48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos. Além disso, ambos os fármacos, foram capazes de diminuir o número de leucócitos no sangue, apenas na primeira fase (4 h);
2. O PK11195 e o Ro5-4864, foram capazes de diminuir de forma significativa o exsudato e os níveis de óxido nítrico na cavidade pleural, como também a permeabilidade vascular nos pulmões, na primeira (4 h) fase desta resposta inflamatória;
3. O Ro5-4864 também foi capaz de diminuir a concentração de mieloperoxidase na primeira (4 h) fase da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.
4. O PK11195 e o Ro5-4864, diminuíram as concentrações da adenosina-deaminase no lavado pleural de camundongos com pleurisia 48 h após;
5. O PK11195 e o Ro5-4864, inibiram a migração leucocitária (4 e 48 h) e o edema (4 h). No baço o PK11195 e o Ro5-4864 inibiram os leucócitos e aumentaram a apoptose celular. No fígado, observou-se que os dois fármacos diminuíram o influxo de neutrófilos e a hiperplasia de células de Küppfer.

6. A DL-aminoglutatimida reverteu o efeito antiinflamatório do PK11195 e Ro5-4864, demonstrando assim a participação destes fármacos na esteroidogênese.

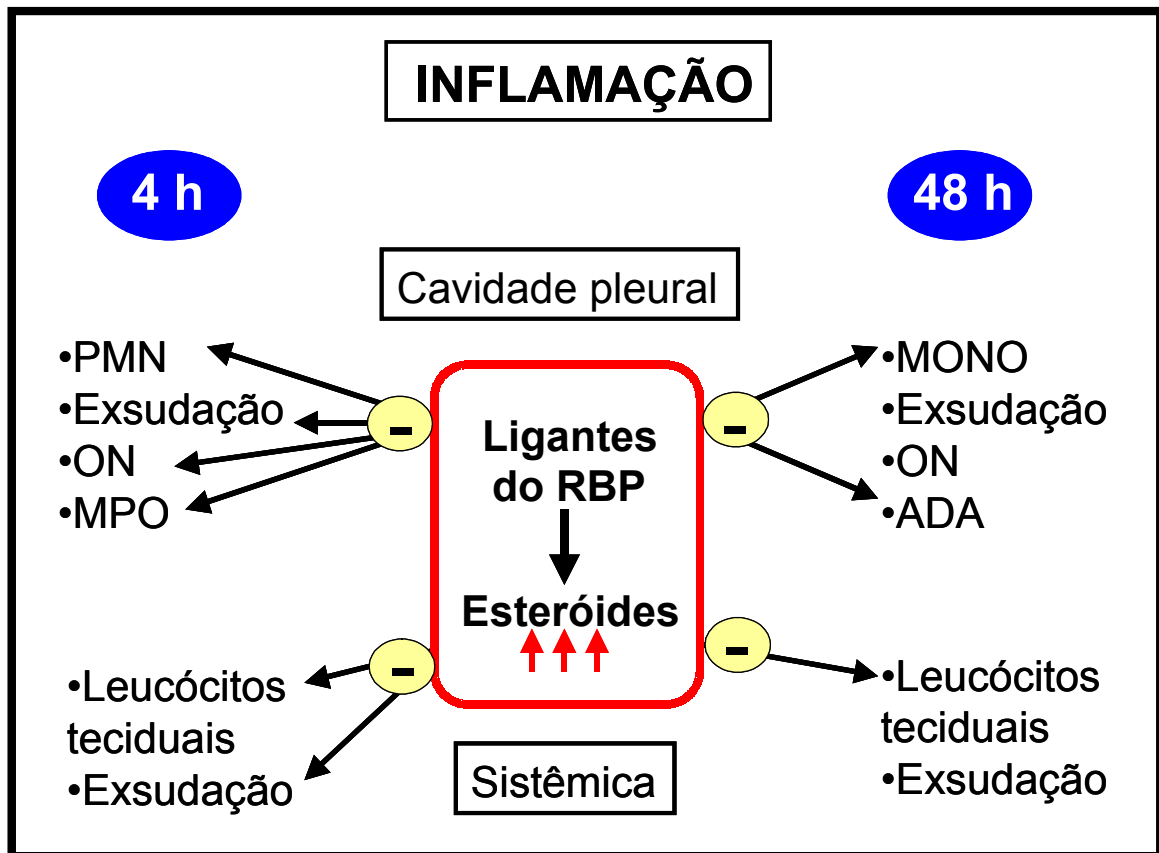


Figura 52 – Esquema proposto do mecanismo de ação antiinflamatório dos ligantes do Receptor Benzodiazepínico Periférico

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.O. *Imunologia celular e molecular*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2003, p. 235-269.

ABBRACCHIO, M.P.; BRAMBILLA, R.; CERUTI, S.; KIM, H.O.; VON LUBITZ, D.K.; JACOBSON, K.A.; CATTABENI, F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol*, v. 48, p. 1038-1045, 1995.

ABBRACCHIO, M.P.; CAMURRI, A.; CERUTI, S.; CATTABENI, F.; FALZANO, L.; GIAMMARIOLI, A.M.; JACOBSON, K.A.; TRINCAVELLI, L.; MARTINI, C.; MALORNI, W.; FIORENTINI, C. The A3 adenosine receptor induces cytoskeleton rearrangement in human astrocytoma cells via a specific action on Rho proteins. *Ann N Y Acad Sci*, v. 939, p. 63-73, 2001.

ADCOCK, I.M.; ITO, K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis*, v. 55, p. 256-266, 2000.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, v. 1, p. 15-22, 2003.

ALHO, H.; VARGA, V.; KRUEGER, K.E. Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell Growth Differ*, v. 5, p. 1005-1014, 1994.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Med Clin North Am*, v. 81, p. 1-28, 1997.

AMERICAN LUNG ASSOCIATION. EPIDEMIOLOGY & STATISTICS UNIT. RESEARCH AND SCIENTIFIC AFFAIRS: *Trends in Asthma and mortality*, 2003.

AMSTERDAM, A.; SUH, B.S. An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells. *Endocrinol*, v. 129, p. 503-510, 1991.

ANHOLT, R.R.; DE SOUZA, E.B.; KUCHAR, M.J.; SNYDER, S.H. Depletion of peripheral-type benzodiazepine receptors after hypophysectomy in rat adrenal gland and testis. *Eur J Pharmacol*, v. 110, p. 41-46, 1985b.

ANHOLT, R.R.; DE SOUZA, E.B.; OSTER-GRANITE, M.L.; SNYDER, S.H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther.* v, 233, p. 517-526, 1985a.

ARGUELLES, A.E.; ROSNER, J. Letter: Diazepam and plasma-testosterone levels. *Lancet*, v. 2, p. 607, 1975.

AVONTUUR, J.A.; BUIJK, S.L.; BRUINING, H.A. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 54, p. 627-631, 1998.

BARNEA, E.R.; FARES, F.; GAVISH, M. Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol*, v. 64, p. 155-159, 1989.

BARNES, P.J. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 29, p. 867-870, 1997.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Barnes Trends Pharmacol Sci*, v. 18, p. 46-50, 1997.

BARNES, P.J.; CHUNG, K.F.; PAGE, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*, v. 50, p. 515-96, 1998.

BARNES, P.J.; PEDERSEN, S.; BUSSE, W.W. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 3, p. 1-5, 1998.

BASILE, A.S.; GAMMAL, S.H. Evidence for the involvement of the benzodiazepine receptor complex in hepatic encephalopathy. Implications for treatment with benzodiazepine receptor antagonists. *Clin Neuropharmacol*, v.5, p. 401-422, 1988.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 9-21.

BERNASSAU, J.M.; REVERSAT, J.L.; FERRARA, P.; CAPUT, D.; LEFUR, G. A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport. *J Mol Graph*, v. 11, p. 236-244, 1993.

BESMAN, M.J.; YANAGIBASHI, K.; LEE, T.D.; KAWAMURA, M.; HALL, P.F.; SHIVELY, J.E. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, p. 4897-4901, 1989.

BICKEL, M.; COHEN, R.B.; PLUZNIK, D.H. Post-transcriptional regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis in murine T cells. *J Immunol*, v.145, p. 840-845, 1990.

BLACKBURN, M.R.; DATTA, S.K.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. *J Biol Chem*, v. 273, p. 5093-5100, 1998.

BLAHOS, J. 2<sup>ND</sup>.; WHALIN, M.E.; KRUEGER, K.E. Identification and purification of a 10-kilodalton protein associated with mitochondrial benzodiazepine receptors. *J Biol Chem*, v. 270, p. 20285-20291, 1995.

BOXER, L.A. Distúrbio da função dos fagócitos. (In). GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. (Eds). Cecil tratado de medicina interna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p 1013-1022, 2001.

BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R.F. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 74, p. 3805-3809, 1977.

BRESSAN, E.; FARGES, R.C.; FERRARA, P.; TONUSSI, C.R. Comparison of two PBR ligands with classical antiinflammatory drugs in LPS-induced arthritis in rats. *Life Sci*, v. 72, p. 2591-2601, 2003.

BURNSTOCK, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling. *Clin Med*, v. 2, p. 45-53, 2002

CALOGERO, A.E.; KAMILARIS, T.C.; BERNARDINI, R.; JOHNSON, E.O.; CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 253, p. 729-737, 1990.

CARMAN, C.V.; JUN, C.D.; SALAS, A.; SPRINGER, T.A. Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. *J Immunol*, v. 171, p. 6135-6144, 2003.

CASELLAS, P.; GALIEGUE, S.; BASILE, A.S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int*, v. 40, p. 475-486, 2002.

CAVALLARO, S.; KORNEYEV, A.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89: 10598-10602, 1992.

CHERTIN, B.; ROLLE, U.; FARKAS, A.; PURI, P. The role of nitric oxide in reflux nephropathy. *Pediatr Surg Int*, 630-644, 2002.

CHICHE, J.D.; SHIDASP, S.; DHAINAUT, J.F.; MIRA, J.P. Cytokine Polymorphisms and Susceptibility to Severe Infections Diseases. *Sepsis*, v. 4, p. 209-215, 2001.

CHOBOTOVA, K.; MUCHMORE, M.E.; CARVER, J.; YOO, H.J.; MANEK, S.; GULLICK, W.J.; BARLOW, D.H.; MARDON, H.J. The mitogenic potential of heparin-binding epidermal growth factor in the human endometrium is mediated by the epidermal growth factor receptor and is modulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 5769-5777, 2002.

CHRISTMAN, J.W.; SADIKOT, R.T.; BLACKWELL, T.S. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest*, v.5, p. 1482-1487, 2000.

COMBARROS, O.; INFANTE, J.; LLORCA, J.; PENA, N.; FERNANDEZ-VIADERO, C.; BERCIANO, J. The myeloperoxidase gene in Alzheimer's disease: a case-control study and meta-analysis. *Neurosci Lett*, v. 326, p. 33-36, 2002.

CONE, J.B. Inflammation. *The American Journal of Surgery*, v. 182, p. 558-562, 2001.

CONRAN, N.; GAMBERO, A.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochem Pharmacol*, v. 66, p. 43-50, 2003.

CUZZOCREA, S.; MASÓN, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F.A.; CAPUTI, A.P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 162, p. 1859-1866, 2000.



DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTENBI, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. *Prostag Leukot ess*, v. 54, p. 229-238, 1996.

DIACON, A.H.; VAN DE WAL, B.W.; WYSER, C.; SMEDEMA, J.P.; BEZUIDENHOUT, J.; BOLLIGER, C.T.; WALZL, G. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur Respir J*, v. 22, p. 589-591, 2003.

DIKENSOY, O.; NAMIDURU, M.; HOCAOGLU, S.; IKIDAG, B.; FILIZ, A. Increased pleural fluid adenosine deaminase in brucellosis is difficult to differentiate from tuberculosis. *Respiration*, v. 69, p. 556-559, 2002.

DOHERTY, N.S.; ROBINSON, B.V. Some biological and pharmacological properties of inflammatory exudates. *J Pharm Pharmacol*, v. 28, p. 859-864, 1976.

EREL, O.; KOCYIGIT, A.; GUREL, M.S.; BULUT, V.; SEYREK, A.; OZDEMIR, Y. Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 491-494, 1998.

EVILEVITCH, V.; WU, T.T.; LINDGREN, L.; GREIFF, L.; NORRGREN, K.; WOLLMER, P. Time course of the inflammatory response to histamine and allergen skin prick test in guinea-pigs. *Acta Physiol Scand*, v. 165, p. 409-413, 1999.

FEOKTISTOV, I.; GOLDSTEIN, A.E.; RYZHOV, S.; ZENG, D.; BELARDINELLI, L.; VOYNO-YASENETSKAYA, T.; BIAGGIONI, I. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res*, v. 90, p. 531-538, 2002.

FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; FARBSTAIN, T.; BARER, F.; OHANA, G. Adenosine acts as a chemoprotective agent by stimulating G-CSF production: a role for A1 and A3 adenosine receptors. *J Cell Physiol*, v. 183, p. 393-398, 2000a.

FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; OHANA, G.; PATHAK, S.; WASSERMAN, L.; BARER, F.; MULTANI, A.S. Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor. *Eur J Cancer*, v. 36, p. 1452-1458, 2000b.

FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; VAGMAN, L. Adenosine and other low molecular weight factors released by muscle cells inhibit tumor cell growth. *Cancer Res*, v. 58, p. 3181-3187, 1998.

FOLKERTS, G.; KLOEK, J.; MUIJSERS, R.B.; NIJKAMP, F.P. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 429, p. 251-262, 2001.

FOZARD, J.R.; ELLIS, K.M.; VILLELA DANTAS, M.F.; TIGANI, B.; MAZZONI, L. Effects of CGS 21680, a selective adenosine A2A receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. *Eur J Pharmacol*, v. 438, p. 183-188, 2002.

FRANGOGIANNIS NG, MENDOZA LH, LEWALLEN M, MICHAEL LH, SMITH CW, ENTMAN ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J*, v. 15, p. 1428-1430, 2001.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Ver*, v. 53, p. 527-552, 2001.

FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*, v. 10, p. 223-227, 2001.

FRODE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, p. 149-156, 2002.

FRODE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 13, p. 162-168, 2001.

GALIEGUE, S.; JBILO, O.; COMBES, T.; BRIBES, E.; CARAYON, P.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem*, v. 274, p. 2938-2952, 1999.

GARNIER, M.; DIMCHEV, A.B.; BOUJRAD, N.; PRICE, J.M.; MUSTO, N.A.; PAPADOPOULOS, V. In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Mol Pharmacol*, v. 45, p. 201-11, 1994.

GASSER, O.; HESS, C.; MIOT, S.; DEON, C.; SANCHEZ, J.C.; SCHIFFERLI, J.A. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*, v. 285, p. 243-257, 2003.

GELFAND EW. Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists. *Am J Med*, v. 9, p. 2-7, 2002.

GHERARDI, M.M.; RAMIREZ, J.C.; ESTEBAN, M. IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J Gen Virol*, v. 84, p. 1961-1972, 2003.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, v. 16, p. 225-260, 1998.

GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; McMASTER, S.; SAWATZKY, D.A.; WILLOUGHBY, D.A.; LAWRENCE, T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J*, v. 15, p. 2269-2271, 2003.

GLATT, M.; DIEPPE, P.; WILLOUGHBY, D.A. Crystal-induced inflammation, enzyme release and the effects of drugs in the pleural space. *J. Rheumatol*, v. 6, p. 251-258, 1979.

GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNEBAUN, S.B. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREIFF, L.; WOLLMER, P.; ANDERSSON, M.; SVENSSON, C.; PERSSON, C.G. Effects of formoterol on histamine induced plasma exudation in induced sputum from normal subjects. *Thorax*, v. 53, p. 1010-1013, 1998.

GRIFFITHS, R.J. Prostaglandins and Inflammation. (In) GALLIN, J.L.; SNYDERMAN, R. (Eds). *Inflammation: Basic Principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 349-360.

GUIDOTTI, A.; FORCHETTI, C.M.; CORDA, M.G.; KONKEL, D.; BENNETT, C.D.; COSTA, E. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, p. 3531-3535, 1983.

HAMID, Q. Effects of steroids on inflammation and cytokine gene expression in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, v. 112, p. 636-638, 2003.

HAN, L.; SAITO, H.; FUKATSU, K.; INOUE, T.; YASUHARA, H.; FURUKAWA, S.; MATSUDA, T.; LIN, M.T.; IKEDA, S. Ex vivo fluorescence microscopy provides simple and accurate assessment of neutrophil-endothelial adhesion in the rat lung. *Shock*, v. 16, p. 143-147, 2001.

HANDEL, M.L.; NGUYEN, L.Q.; LEHMANN, T.P. Inhibition of transcription factors by anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs: can variability in response be overcome? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 27, p.139-44, 2000.

HANSEL, T.T.; KHARITONOV, S.A.; DONNELLY, L.E.; ERIN, E.M.; CURRIE, M.G.; MOORE, W.M.; MANNING, P.T., RECKER, D.P.; BARNES, P.J. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J*, v. 17, p. 1298-1300, 2003.

HARDWICK, M.; FERTIKH, D.; CULTY, M.; LI, H.; VIDIC, B.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res*, v. 59, p. 831-842, 1999.

HASHIMOTO, I.; KODAMA, J.; SEKI, N.; HONGO, A.; MIYAGI, Y.; YOSHINOCHI, M.; KUDO, T. Macrophage infiltration and angiogenesis in endometrial cancer. *Anticancer Res*, v. 20, p. 4853-4856, 2000.

HASHIMOTO, S.; SUZUKI, T.; DONG, H.Y.; NAGAI, S.; YAMAZAKI, N.; MATSUSHIMA, K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, v. 94, p. 845-852, 1999.

HASKO, G.; NEMETH, Z.H.; VIZI, E.S.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur J Pharmacol*, v. 358, p. 261-268, 1998.

HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; FUJITA, T.; ARAYA, J.; SASSA, K.; ARAI, N.; YOSHIDA, Y.; KASHII, T.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Eur Respir J*, v. 16, p. 452-458, 2000.

HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 161, p. 117-119, 2000.

HENNINGSSON, R.; SALEHI, A.; LUNDQUIST, I. Role of nitric oxide synthase isoforms in glucose-stimulated insulin release. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 283, p. 296-304, 2002.

HENRIQUES, M.G. Estudo da Reação Inflamatória induzida por carragenina em camundongos. Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Oswaldo Cruz. *R. J. Brazil*. PhD. Thesis, 1990, p. 1-181.

HIRSCH, T.; DECAUDIN, D.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; LAROCLETTE, N.; RESCHE-RIGON, M.; KROEMER, G. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res*, v. 241, p. 426-434, 1998.

HITOGLOU, S.; HATZISTILIANOU, M.; GOUGOUSTAMOU, D.; ATHANASSIADOU, F.; KOTSIS, A.; CATRIU, D. Adenosine-deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, v. 20, p. 411-416, 2001.

HOPKINS, S.J. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo)*, v. 1, p. 45-57, 2003.

HUANG, C.D.; TLIBA, O.; PANETTIERI, R.A. JR.; AMRANI, Y. Bradykinin induces interleukin-6 production in human airway smooth muscle cells: modulation by Th2 cytokines and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 28, p. 330-338, 2003.

HUBBARD, A.K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, v. 28, p. 1379-1386, 2000.

JONES, S.P.; TROCHA, S.D.; STRANGE, M.B.; GRANGER, D.N.; KEVIL, C.G.; BULLARD, D.C.; LEFER, D.J. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 279, p. 2196-2201, 2000.

JOSEPH-LIAUZUN, E.; DELMAS, P.; SHIRE, D.; FERRARA, P. Topological analysis of the peripheral benzodiazepine receptor in yeast mitochondrial membranes supports a five-transmembrane structure. *J Biol Chem*, v. 273, p. 2146-2152, 1998.

JUNG, U.; NORMAN, K.E.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BEAUDET, A.L.; LEY, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest*, v. 102, p. 1526-1533, 1998.

JUTEL, M.; WATANABE, T.; AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol*, v. 6, p. 735-740, 2002.

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SHIBAYAMA, Y.; NAKAZAWA, Y.; GHEBREHIWET, B.; REDDIGARI, S.; SILVERBERG, M. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol*, v. 16, p. 403-429, 1998.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*, v. 18, p. 621-663, 2000.

KATZ, Y.; BEN-BARUCH, G.; KLOOG, Y.; MENCZER, J.; GAVISH, M. Increased density of peripheral benzodiazepine-binding sites in ovarian carcinomas as compared with benign ovarian tumours and normal ovaries. *Clin Sci*, v. 78, p. 155-158, 1990.

KATZ, Y.; EITAN, A.; GAVISH, M. Increase in peripheral benzodiazepine binding sites in colonic adenocarcinoma. *Oncol*, v. 47, p. 139-142, 1990.

KEVIL, C.G. Endothelial cell activation in inflammation: lessons from mutant mouse models. *Pathophysiol*, v. 9, p. 63-74, 2003.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, v. 111, p. 383-389, 1999.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, v. 298, p. 249-58, 1994.

KRIEGLSTEIN, C.F.; GRANGER, D.N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*, v. 14, p. 44-54, 2001.

LACAPERE, J.J.; DELAVOIE, F.; LI, H.; PERANZI, G.; MACCARIO, J.; PAPADOUPOLUS, V.; VIDIC, B. Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 284, p. 536-541, 2001.

LACAPERE, J.J.; PAPADOUPOLUS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids*, v. 68, p. 569-585, 2003.

LACOR, P.; GANDOLFO, P.; TONON, M.C.; BRAULT, E.; DALIBERT, I.; SCHUMACHER, M.; BENAVIDES, J.; FERZAZ, B. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res*, v. 815, p. 70-80, 1999.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B.E.; MUSCARA, M.N.; DE NUCCI, G.; PALERMONETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. *Life Sci*, v. 72, p. 2361-2368, 2003.

LE FUR, G.; VAUCHER, N.; PERRIER, M.L.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; UZAN, A. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies. *Life Sci*, v. 33, p. 449-457, 1983.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C.A. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides*, v. 34, p. 303-313, 2000.

LEE, H.T.; XU, H.; NASR, S.H.; SCHNERMANN, J.; EMALA, C.W. A1 adenosine receptor knock-out mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 286, p. 298-306, 2003.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, v. 2, p. 975, 2002.

LINCOLN, T.M.; KORNALAVILAS, P. Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 401-425.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 41, p. 775-787, 2001.

LIU, M.C.; PROUD, D.; LICHTENSTEIN, L.M.; HUBBARD, W.C.; BOCHNER, B.S.; STEALEY, B.A.; BRESLIN, L.; XIAO, H.; FREIDHOFF, L.R.; SCHROEDER, J.T.; SCHLEIMER, R.P. Effects of prednisone on the cellular responses and release of

cytokines and mediators after segmental allergen challenge of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, v. 108, p. 29-38, 2001.

LOSSOS, I.S.; IZBICKI, G.; OR, R.; GOLDSTEIN, R.H.; BREUER, R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. *Life Sci*, v. 67, p. 2873-2881, 2000.

MABLEY, J.; SORIANO, F.; PACHER, P.; HASKO, G.; MARTON, A.; WALLACE, R.; SALZMAN, A.; SZABO, C. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *Eur J Pharmacol*, v. 466, p. 323-329, 2003.

MAJIMA, M.; KAWASHIMA, N.; HIROSHI, I.; KATORI, M. Effects of an orally active non-peptide bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist, FR173657, on plasma exudation in rat carrageenan-induced pleurisy. *Br J Pharmacol*, v. 121, p. 723-730, 1997.

MARAK, G.E. JR.; DE KOZAK, Y.; FAURE, J.P.; RAO, N.A.; ROMERO, J.L.; WARD, P.A.; TILL, G.O. Pharmacologic modulation of acute ocular inflammation. I. Adenosine. *Ophthalmic Res*, v. 20, p. 220-226, 1988.

MARUO, N.; MORITA, I.; SHIRAO, M.; MUROTA, S. IL-6 increases endothelial permeability *in vitro*. *Endocrinol*, v. 131, p. 710-714, 1992.

MASON, M.D.; DAVIES, G.; JIANG, W.G. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 41, p. 11-28, 2002.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem*, v. 11, p. 1995-2000, 2003.

MATSUO, T.; KURIYAMA, K.; MIYAZAKI, Y.; YOSHIDA, S.; TOMONAGA, M.; EMI, N.; KOBAYASHI, T.; MIYAWAKI, S.; MATSUSHIMA, T.; SHINAGAWA, K.; HONDA, S.; OHNO, R. Japan Adult Leukemia Study Group. The percentage of myeloperoxidase-positive blast cells is a strong independent prognostic factor in acute myeloid leukemia, even in the patients with normal karyotype. *Leukemia*, v. 17, p.1538-1543, 2003.

McDONALD, D.M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*. v. 6, p. 7-22, 1999.



McKAY, L.I.; CIDLOWSKI, J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, v. 20, p. 435-59, 1999.

MERIGHI, S.; MIRANDOLA, P.; MILANI, D.; VARANI, K.; GESSI, S.; KLOTZ, K.N.; LEUNG, E.; BARALDI, P.G.; BOREA, P.A. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, v. 119, p. 923-933, 2002.

MITTERBAUER, C.; SCHWARZ, C.; HAUSER, P.; STEININGER, R.; REGELE, H.M.; ROSENKRANZ, A.; OBERBAUER, R. Impaired tubulo interstitial expression of endothelin-1 and nitric oxide isoforms in donor kidney biopsies with postischemic acute renal failure. *Transplantation*, v. 76, p. 715-720, 2003.

MODEER, T.; ANDUREN, I.; YUCEL-LINDBERG, T. Bradykinin synergistically stimulates interleukin 6 production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin 1 or tumour necrosis factor alpha. *Cytokine*, v 10, p. 26-31, 1998.

MOHAMMED, N.A.; ABD EL-ALEEM, S.; APPLETON, I.; MAKLOUF, M.M.; SAID, M.; MCMAHON, R.F. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human liver cirrhosis. *J Pathol*, v. 200, p. 647-655, 2003.

MOTOHIRO, A.; FURUKAWA, T.; YASUMOTO, K.; INOKUCHI, K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. *Eur Surg Res*, v. 18, p. 50-57, 1986.

MUKHIN, A.G.; PAPADOPOULOS, V.; COSTA, E.; KRUEGER, K.E. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, p. 9813-9816, 1989.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*, v. 82, p. 521-533, 2002.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, v. 24, p. 327-34, 2003.

MUTZE, S.; HEBLING, U.; STREMMEL, W.; WANG, J.; ARNHOLD, J.; PANTOPOULOS, K.; MUELLER, S. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. *J Biol Chem*, v. 278, p. 40542-405429, 2003.

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v.43, p 109-142, 1991.

NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS. *Report of Final Mortality Statistics: 1979-2000*.

NEWTON, R.; SEYBOLD, J.; KUITERT, L.M.; BERGMANN, M.; BARNES, P.J. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*. v. 273, p. 32312-32321, 1998.

O'BEIRNE, G.B.; WOODS, M.J.; WILLIAMS, D.C. Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver. *Eur J Biochem*, v. 188, p. 131-138, 1990.

O'HARA, M.F.; NIBBIO, B.J.; CRAIG, R.C.; NEMETH, K.R.; CHARLAP, J.H.; KNUDSEN, T.B. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate oxygen homeostasis in the early mouse embryo. *Reprod Toxicol*, v. 17, p. 365-375, 2003.

OLSEN, R.W.; HOMANICS, G.E. Function of GABAA receptors: insight from mutant and knockout mice. (In). MARTIN, D.L.; OLSEN, R.W. GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years. (Eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 81-96.

OLSON, J.M.; CILIAUX, B.J.; MANCINI, W.R.; YOUNG, A.B. Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol*, v. 152, p. 47-53, 1988.

PAEGELOW, I.; WERNER, H.; REISSMANN, S. Effects of bradykinin and bradykinin analogues on spleen cells of mice. *Eur J Pharmacol*, v. 279, p. 211-216, 1995.

PAN, Z.K.; YE, R.D.; CHRISTIANSEN, S.C.; JAGELS, M.A.; BOKOCH, G.M.; ZURAW, B.L. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells. *J Immunol*, v. 160, p. 3038-3045, 1998.

PANES, J. Adhesion molecules: their role in physiopathology and treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*, v. 22, p. 514-524, 1999.

PAPADOPOULOS, V.; AMRI, H.; BOUJRAD, N.; CASCIO, C.; CULTY, M.; GARNIER, M.; HARDWICK, M.; LI, H.; VIDIC, B.; BROWN, A.S.; REVERSA, J.L.; BERNASSAU, J.M.; DRIEU, K. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids*, v. 62, p. 21-28, 1997.

PAPADOPOULOS, V.; BERKOVICH, A.; KRUEGER, K.E. The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. *Neuropharmacol*, v. 12, p. 1417-1423, 1991.

PAPADOPOULOS, V.; GUARNERI, P.; KREUGER, K.E.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, p. 5113-5117, 1992.

PAPADOPOULOS, V.; MUKHIN, A.G.; COSTA, E.; KRUEGER, K.E. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem*, v. 265, p. 3772-3779, 1990.

PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol*, v. 65, p. 153-159, 2003.

PAROLA, A.L.; YAMAMURA, H.I.; LAIRD, H.E<sup>rd</sup>. Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Life Sci*, v. 52, p. 1329-1342, 1993.

PELAIA, G.; VATRELLA, A.; CUDA, G.; MASELLI, R.; MARSICO, S.A. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci*, v. 72, p. 1549-1561, 2003.

PENROSE, J.F.; AUSTEN, K.F.; LAM, B.K. Leukotrienes: biosynthetic pathway, release and receptor-mediated actions with relevance to disease states. (In). GALLIN, J.L.; SNYDERMAN, R. (Eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 361-372.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 279-289.

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, p. 723-741, 1993.

REDONDO, P. Update on melanoma: incidence, development and biological aspects. *An Sist Sanit Navar*, v. 23, p. 67-92, 2000.

RIOND, J.; LEPLATOIS, P.; LAURENT, P.; LE FUR, G.; CAPUT, D.; LOISON, G.; FERRARA, P. Expression and pharmacological characterization of the human peripheral-type benzodiazepine receptor in yeast. *Eur J Pharmacol*, v. 208, p. 307-312, 1991.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G.A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol*, v. 2, p. 603-630, 2002.

ROCCA, B.; SECCHIERO, P.; CIABATTONI, G.; RANELLETTI, F.O.; CATANI, L.; GUIDOTTI, L.; MELLONI, E.; MAGGIANO, N.; ZAULI, G.; PATRONO, C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 7634-7639, 2002.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol*, v. 118, p. 811-819, 1996.

SALEH, T.S.; VIANNA, R.M.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, v. 363, p. 179-187, 1998.

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, p. 949-956, 1999.

SALERNO, L.; SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; ROMEO, G.; SIRACUSA, M.A. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des*, v. 8, p. 177-200, 2002.

SARI, R.A.; TAYSI, S.; YILMAZ, O.; BAKAN, N. Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, v. 21, p. 87-90, 2003.

SATHAR, M.A.; UNGERER, J.P.; LOCKHAT, F.; SIMJEE, A.E.; GOUWS, E. Elevated adenosine deaminase activity in patients with HIV and tuberculous peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 11, p. 337-341, 1999.

SCHNEIDER, E.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; AROCK, M.; DY, M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol*, v. 5, p. 255-263, 2002.

SCHOEMAKER, M.H.; ROS, J.E.; HOMAN, M.; TRAUTWEIN, C.; LISTON, P.; POELSTRA, K.; VAN GOOR, H.; JANSEN, P.L.; MOSHAGE, H. Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB-regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis. *J Hepatol*, v. 36, p. 742-750, 2002.

SCHRIER, D.J.; LESCH, M.E.; WRIGHT, C.D.; GILBERTSEN, R.B. The antiinflammatory effects of adenosine receptor agonists on the carrageenan-induced pleural inflammatory response in rats. *J Immunol*, v. 145, p. 1874-1879, 1990.

SEDWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of inflammatory response and its prevention. (In) BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. (Eds). Handbook of inflammation. New York: Elsevier, 1985, p. 27-47.

SERHAN, C.N.; OLIW, E. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest*, v. 107, p. 1481-1489, 2001.

SHARMA, S.K.; EBADI, M. Metallothionein attenuates 3-morpholinopyridone (SIN-1)-induced oxidative stress in dopaminergic neurons. *Antioxid Redox Signal*, v. 5, p. 251-264, 2003.

SIEGELMAN, M.H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *J Clin Invest*, v. 105, p. 683-691, 2000.

SIMONS, F.E. Comparative pharmacology of H1 antihistamines: clinical relevance. *Am J Med*, v. 9, p. 38-46, 2002.

SINGBARTL, K.; GREEN, S.A.; LEY, K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J*, v. 14, p. 48-54, 2000.

SMITH, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol*, v. 263, p. 181-191, 1992.

SMITH, W.L.; LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*, v. 107, p. 1491-1495, 2001.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J Pathol Bact*, v. 72, p. 367-380, 1956.

SPOELSTRA, F.M.; POSTMA, D.S.; HOVENGA, H.; NOORDHOEK, J.A.; KAUFFMAN, H.F. Budesonide and formoterol inhibit ICAM-1 and VCAM-1 expression of human lung fibroblasts. *Eur Respir J*, v. 15, p. 68-74, 2000.

SPRENGEL, R.; WERNER, P.; SEEBURG, P.H.; MUKHIN, A.G.; SANTI, M.R.; GRAYSON, D.R.; GUIDOTTI, A.; KRUEGER, K.E. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. *J Biol Chem*, v. 264, p. 20415-20421, 1989.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 35, p. 881-900, 2003.

SYAPIN, P.J.; SKOLNICK, P. Characterization of benzodiazepine binding sites in cultured cells of neural origin. *J Neurochem*, v. 32, p. 1047-1051, 1979.

SZABO, C.; SCOTT, G.S.; VIRAG, L.; EGNACZYK, G.; SALZMAN, A.L.; SHANLEY, T.P.; HASKO, G. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br J Pharmacol*, v. 125, p. 379-387, 1998.

TACHIMOTO, H.; EBISAWA, M.; BOCHNER, B.S. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 128, p. 18-20, 2002.

TAK, P.P.; FIRESTEIN, G.S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, v. 107, p. 7-11, 2001.

TAN, P.; LUSCINSKAS, F.W.; HOMER-VANNIASINKAM, S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 17 p. 373-389, 1999.

TANAKA, Y.; YOSHIHARA, K.; TSUYUKI, M.; KAMIYA, T. Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL-60 cells. *Exp Cell Res*, v. 213, p.242-252, 1994.

TORRES, S.R.; FRODE, T.S.; NARDI, G.M.; VITA, N.; REEB, R.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARGES, R.C. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 408, p. 199-211, 2000.

TORRES, S.R.; NARDI, G.M.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARGES, R.C. Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. *Eur J Pharmacol*, v. 385, R1-2, 1999.

TURNBERG, D.; BOTTO, M. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol Immunol*, v. 40, p. 145-153, 2003.

TURUTIN, D.V.; KUBAREVA, E.A.; PUSHKAREVA, M.A.; ULLRICH, V.; SUD'INA, G.F. Activation of NF-kappa B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. *FEBS Lett*, v. 536, p. 241-245, 2003.

VERMA, A.; NYE, J.S.; SNYDER, S.H. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, p. 2256-2260, 1987.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Fed Proc*, v. 41, p. 2588-2595, 1976.

VIZJAK, A.; ROTT, T.; KOSELJ-KAJTNA, M.; ROZMAN, B.; KAPLAN-PAVLOVICIC, S.; FERLUGA, D. Histologic and immunohistologic study and clinical presentation of ANCA-associated glomerulonephritis with correlation to ANCA antigen specificity. *Am J Kidney Dis*, v. 41, p. 539-549, 2003.

WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, v. 344, p. 1058-1066, 2001.

WALPORT, M.J. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*, v. 344, p. 1140-1144, 2001.

WALRAND, S.; VALEIX, S.; RODRIGUEZ, C.; LIGOT, P.; CHASSAGNE, J.; VASSON, M.P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta*, v. 331, p. 103-110, 2003.

WALZOG, B.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.; GAEHTGENS, P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol*, v. 276, p. 1125-1130, 1999.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, v. 7, p. 53-58, 2000.

WITTE, M.B.; THORNTON, F.J.; TANTRY, U.; BARBUL, A. L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism*, v. 51, p. 1269-1273, 2002.

WONG, M.M.; FISH, E.N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol*, v. 15, p. 5-14, 2003.

WOODS, M.J; WILLIAMS, D.C. Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem Pharmacol*, v. 52, p. 1805-1814, 1996.

XIAO, H.; HEERINGA, P.; HU, P.; LIU, Z.; ZHAO, M.; ARATANI, Y.; MAEDA, N.; FALK, R.J.; JENNETTE, J.C. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*, v. 110, p. 955-963, 2002.

XU, N.; RAHMAN, A.; MINSHALL, R.D.; TIRUPPATHI, C.; MALIK, AB. beta(2)-Integrin blockade driven by E-selectin promoter prevents neutrophil sequestration and lung injury in mice. *Circ Res*, v. 87, p. 254-260, 2000.

YADAV, S.S.; HOWELL, D.N.; GAO, W.; STEEBER, D.A.; HARLAND, R.C.; CLAVIEN, P.A. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol*, v. 275, p. 1341-1352, 1998.

YAMAMOTO, S.; DUNN, C.J.; CAPASSO, F.; DEPORTER, D.A.; WILLOUGHBY, D.A.; HUSKISSON, E.C. Quantitative studies on cell-mediated immunity in the pleural cavity of guinea pigs. *J Pathol*, v. 117, p.65-73, 1975.

YAMAZAKI, S.; MUTA, T.; TAKESHIGE, K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, v. 276, p. 27657-27662, 2001.



YONEYAMA, Y.; SAWA, R.; SUZUKI, S.; OTSUBO, Y.; MIURA, A.; KUWABARA, Y.; ISHINO, H.; KIYOKAWA, Y.; DOI, D.; YONEYAMA, K.; KOBAYASHI, H.; ARAKI, T. Serum adenosine deaminase activity in women with pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, v. 54, p. 164-167, 2002.

ZAVALA, F. Benzodiazepines, anxiety and immunity. *Pharmacol Ther*, v. 75, p. 199-216, 1997.

ZHU, Y.M.; BRADBURY, D.A.; PANG, L.; KNOX, A.J. Transcriptional regulation of interleukin (IL)-8 by bradykinin in human airway smooth muscle cells involves prostanoid-dependent activation of AP-1 and nuclear factor (NF)-IL-6 and prostanoid-independent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem*, v. 278, p. 29366-29375, 2003.

# **ANEXOS**