

ROBSON ROMAN PEREIRA

**ESTUDO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DO
TACROLIMUS NO MODELO DE PLEURISIA, EM
CAMUNDONGOS.**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.**

Florianópolis

2006

ROBSON ROMAN PEREIRA

**ESTUDO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DO
TACROLIMUS NO MODELO DE PLEURISIA, EM
CAMUNDONGOS.**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.**

**Coordenador do Curso: Profa. Dra. Márcia Margaret Menezes Pizzichini
Orientador: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde**

Florianópolis

2006

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ser meu protetor nas viagens e meu guia nos momentos difíceis.

A Rosane, pelos belos momentos compartilhados durante toda a nossa convivência, pelo companheirismo, carinho, incentivo, atenção, força e principalmente por me dar dois belos e amados filhos. Você sem dúvida é muito especial.

Aos meus filhos, Amanda e Arthur, pelos sorrisos, abraços, pela “compreensão” da minha ausência e pelos apelos de presentes que me acompanharam durante todo o mestrado. Vocês são a minha vida e minha força para viver.

Aos meus pais, por me ensinarem a ser uma pessoa honesta e batalhadora.

Às minhas irmãs, pelas palavras de apoio e carinho.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Tânia S. Fröde, pela preciosa orientação, atenção e confiança em mim depositada.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, que transformaram muitos momentos de angústia e incerteza em força. Ao meu amigo Álvaro, instrutor sempre presente e que me auxiliou muito nos meus experimentos, além das boas risadas; a minha colega Ana, que me acompanhou durante todo o mestrado e me auxiliou nos experimentos, bem como compartilhou momentos de descontração; a minha colega Ziliane, por seu apoio e pelo seu sorriso estimulante; à Silvana, pela orientação e amizade; à Stella, com dois “eles”, que chegou depois e demonstrou uma forma inigualável de ajudar e cativar amigos; à Jucélia, minha colega quieta e observadora; ao Rafael, colega lageano, pelo companheirismo. A todos vocês o desejo de que vocês vençam e o meu muito obrigado.

A Eneita e ao Hélio, que cuidaram muito bem da Amanda e do Arthur, e também pelo apoio e incentivo.

Ao Ronald e Christian, duas pessoas que servem de exemplo profissional, obrigado pela amizade e por demonstrarem sempre estarem prontos a ajudar.

À Flávia e a Flávia, por se preocuparem com as crianças e por nos darem força para esta conquista.

Ao meu colega de Universidade, Ali Saleh Neto, pela ajuda e força para que eu pudesse cursar o mestrado.

Ao meu colega Antonio Jacob Backes, por tomar conta do Laboratório na minha ausência.

Ao secretário do mestrado de Ciências Médicas, Sr. Ivo Soares, que sempre nos atendeu de forma prestativa e atenciosa.

À Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC), por oportunizar o meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Jamil, do Departamento de Farmacologia e ao pessoal do Laboratório, principalmente a Adriane, pela atenção e auxílio nos experimentos.

Aos funcionários do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário pelo auxílio na realização das técnicas.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários do Departamento de Pós-graduação em Ciências Médicas pelo suporte e oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me dedicaram parte de seu tempo e esforço.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
JUSTIFICATIVA.....	23
OBJETIVO	25
MÉTODO.....	26
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	66
PERSPECTIVAS	74
REFERÊNCIAS	75
NORMAS ADOTADAS.....	88

RESUMO

Introdução: O tacrolimus é um agente imunossupressor isolado do *Streptomyces tsukubaensis* e é utilizado principalmente na prevenção de rejeição de órgãos. Além disso, muitos trabalhos têm demonstrado o uso do tacrolimus em doenças de caráter inflamatório crônico como à asma brônquica e artrite reumatóide.

Objetivos: Estudar o efeito antiinflamatório do tacrolimus, na resposta inflamatória induzida por diferentes agentes flogísticos (carragenina: Cg, bradicinina: BK, histamina: HIST ou substância P: SP), em camundongos.

Materiais e Métodos: A administração do fármaco foi realizada por via intra peritoneal (i.p.) ou via oral (v.o.). Os animais utilizados foram camundongos albinos Suíços, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 30 g. A pleurisia foi induzida pela injeção de 0,1 ml por via intrapleural de um dos seguintes agentes flogísticos: Cg (1% 0,1 mL/cav.), BK (10 nmol/cav.), HIST (100 µg/cav.) ou SP (20 nmo/cav.). Os lavados pleurais foram obtidos 4 h após a indução da inflamação. Na pleurisia induzida pela Cg foram avaliadas curvas dose e tempo-resposta. Escolhida a melhor dose e o tempo de tratamento prévio do fármaco que inibiram o influxo de leucócitos para a cavidade pleural, avaliou-se o efeito deste fármaco sobre os parâmetros inflamatórios: atividade da MPO, níveis de nitrato/nitrito (NO^x), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1 beta (IL-1β), proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) e quemocina de neutrófilo (KC) e leucócitos sanguíneos. Os leucócitos também foram avaliados na cavidade pleural na inflamação induzida por BK, HIST ou SP. A análise estatística foi determinada pelos testes: ANOVA, Dunett ou teste T de Student. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

Resultados: Na pleurisia induzida por Cg, o tacrolimus administrado por via intraperitoneal (1mg/kg) ou via oral (10 mg/kg) 0,5 horas antes da indução da inflamação inibiu os leucócitos (P < 0,01) às custas de polimorfonucleares (P < 0,01) e demonstrou efeito antiinflamatório duradouro, pois inibiu os leucócitos quando administrado até 24 h (via i.p.) ou 48 h (v.o) (P < 0,01). O tacrolimus inibiu a atividade da MPO (P < 0,01) e os níveis TNF-α e IL-1β (P < 0,01), mas não as concentrações de óxido nítrico, MIP-2 e KC (P > 0,05). Não houve alteração no nível de leucócitos sanguíneos na pleurisia induzida por Cg. Este fármaco também inibiu a migração de leucócitos na inflamação induzida por BK, HIST ou SP (P < 0,05). Esta redução foi devido a inibição de mononucleares na pleurisia induzida por BK ou HIST (P < 0,05) e polimorfonucleares na pleurisia induzida pela SP (P < 0,01).

Conclusão: Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que o tacrolimus, neste modelo experimental, promoveu importante efeito antiinflamatório, principalmente em nível celular, inibindo os leucócitos, bem como mediadores liberados por células. Várias hipóteses podem ser formuladas para explicar a atividade antiinflamatória deste fármaco: i) Inibição de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1β e TNF-α, responsáveis pela quimiotaxia de leucócitos, no modelo experimental estudado; ii) Inibição de outros mediadores pró-inflamatórios (BK, HIST e SP) também reconhecidos agentes quimiotáticos; iii) Inibição da ativação celular por meio de enzimas do tipo MPO, uma vez que esta enzima é reconhecida ser um marcador de neutrófilos ativados, iv) os resultados obtidos com o tacrolimus e a dexametasona foram também semelhantes, demonstrando que provavelmente os dois fármacos possuem vias comuns de ação antiinflamatória. Futuros estudos devem ser realizados na tentativa de melhor elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório do tacrolimus.

Palavras-chave: tacrolimus, pleurisia, carragenina, citocinas, imunossupressores.

ABSTRACT

Introduction: The tacrolimus is a immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis* and its priorly used in the prevention of acute rejection of allograft transplants. Many studies have been demonstrated that tacrolimus is useful to treated inflammatory diseases such bronquial asthma and rheumatoid arthritis.

Objective: The aim of the present work was to evaluate the anti-inflammatory effect of tacrolimus in the inflammation induced by different phlogogens (carrageenan: Cg, bradykinin: BK, histamine: HIST or substance P: SP) in mice.

Material e Méthods: Tacrolimus was administrated by intraperitoneal (i.p.) or oral routes (v.o.). In this protocol we used adult Swiss mice of both sex (18 e 30 g). The pleurisy was induced by the intrapleural injection of different phlogistic: Cg (1% 0.1 mL/cav), BK (10 nmol/cav.), HIST (100 µg/cav.) or SP (20 nmo/cav.). The pleural leakage was collected 4 h after the inflammation. In the pleurisy induced by Cg the curve dose response and the profile was analysed. After we chose the best dose and pre-treatment time that inhibited the leukocyte influx, we evaluated the effect of this drug upon inflammatory parameters: myeloperoxidase activity (MPO), nitrate/nitrite levels (NO^x), tumor necrosis factor (TNF-α), interleukin-1 beta (IL-1β), macrophage inflammatory protein (MIP)-2 and neutrophil chemokine (KC) concentrations and the leukocytes in the blood. The leukocytes migration was evaluated in the pleurisy induced by BK, HIST or SP. Significant differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA), Dunnett's or Student's t tests. $P < 0.05$ was considered indicative of significance.

Results: In the pleurisy induced by Cg, the tacrolimus administrated by via intraperitoneal (1mg/kg) or oral routes (10 mg/kg) administred 0.5 h before inflammation induction inhibit the leukocyte influx ($P < 0.01$) due to the reduction of polimorphonuclears ($P < 0.01$). The tacrolimus exhibitd a long-lasting anti-inflammatory effect inhibiting the leukocytes influx when was administerd up to 24 h (i.p) or 48 h (v.o.) ($P < 0.01$). The tacrolimus also inhibited the MPO activity ($P < 0.01$) and TNF-α e IL-1β levels ($P < 0.01$), but not the nitric oxide, MIP-2 and KC concentrations ($P > 0.05$). In the pleurisy induced by Cg, the tacrolimus did not modified the leukocytes in the blood. This drug was also able to inhibit the leukocyte migration in the inflammation induced by BK, HIST or SP ($P < 0.05$). This reduction was due to the inhibition of mononuclears in the pleurisy induced by BK or HIST ($P < 0.05$) and polimorphonuclears in the pleurisy induced by SP ($P < 0.01$).

Conclusion: Taken together, these results showed that tacrolimus, in this experimental model of inflammation, caused an important anti-inflammatory effect, priorly at cellular level, inhibiting leucocytes, as well as the mediators released by these cells. Many hypothesis can be formulated to explain the antiinflammatory effect of this drug: i) Inhibition of pro-inflammatory cytokines such IL-1β and TNF-α, responsible for leukocyte chemotaxis in the experimental model studied; ii) Inhibition of others pro-inflammatory mediators (BK, HIT or SP) that also have been recognized as chemotactic agents; iii) Inhibition of cellular activation, because it inhibited myeloperoxidase, an enzyme that are recognized as a marked of activated neutrophils; iv) furthermore, tacrolimus and dexamethasone showed similar antiinflammatory effect suggesting that both drugs can act by similar pathway. Future investigation must be done to better understand the anti-inflammatory action of the tacrolimus.

Keywords: tacrolimus, pleurisy, carrageenan, cytokine, immunosuppressant agents.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Fármacos Imunossupressores

Os fármacos imunossupressores são substâncias utilizadas em terapia imunossupressora para inibir a atividade do sistema imunológico. Clinicamente são utilizados para prevenir a rejeição de órgãos e/ou tecidos transplantados (ex: rim, fígado, pulmão, coração) ou no tratamento de doenças autoimunes (ex.: artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, mistenia gravis)¹⁻⁴.

Os primeiros relatos dos efeitos benéficos de substâncias com atividade imunossupressora datam de 1949, com o uso de cortisona⁵. Estes estudos demonstraram que os sintomas clínicos de pacientes com artrite reumatóide melhoraram após a utilização de cortisona. A busca de novos agentes imunossupressores propiciou a descoberta de outras substâncias com atividade imunossupressora como o metrotexato, a ciclosporina A e o tacrolimus⁶⁻⁹. Os fármacos imunossupressores possuem características peculiares, o que permite classificá-los em cinco diferentes grupos de acordo com o mecanismo de ação: i) Regulação da expressão de gens; ii) Alquilação; iii) Inibidores de fosfatases e quinases; iv) Inibição da síntese de novas purinas e v) Inibição da síntese de novas pirimidinas¹⁰.

Além da sua utilização na prevenção de rejeição de órgãos ou tecidos, especial atenção tem sido enfocada para a utilização dos imunossupressores em uma variedade de doenças, principalmente por possuírem efeitos antiinflamatórios. Os glicocorticóides, produzidos a partir de modificações sintéticas na molécula de cortisol, são utilizados na terapia da asma ou topicamente em doenças de pele^{11,12}. A atividade antiinflamatória do metrotexato e da ciclosporina A, além do tacrolimus também tem sido descrita em modelos animais¹³⁻¹⁵.

1.2. O Tacrolimus

O tacrolimus (TAC), também denominado FK506, é um produto microbiano natural isolado do *Streptomyces tsukubaensis* encontrado na região do monte Tsukuba, no Japão. A descoberta ocorreu em 1984, após dois anos de intensas pesquisas e uma série de testes para determinar se alguma das substâncias coletadas possuía atividade imunossupressora⁸.

A propriedade imunossupressora do TAC resulta no bloqueio da ativação de células T. O TAC liga-se a proteínas intracelulares denominadas imunofilinas, mais especificamente a FKBP12. Este complexo formado pela interação TAC-FKBP12 inibe a enzima calcineurina fosfatase, envolvida na ativação do fator nuclear de células T ativadas (NF-AT). O NF-AT é um fator de transcrição importante na expressão de gens para algumas citocinas liberadas pelas células T¹⁶. A inibição da calcineurina fosfatase resulta, mais especificamente, no bloqueio da produção de citocinas produzidas por células T, tais como a interleucina-2 (IL-2) e o interferon-gama (IF- γ)^{17,18}.

A ciclosporina A (CsA), apesar de ser estruturalmente diferente do TAC, compartilha o mesmo mecanismo de inibição da resposta imunológica, inibindo a enzima calcineurina fosfatase. Todavia, o TAC é de 10 a 100 vezes mais potente que a CsA, inibindo a proliferação de linfócitos, *in vitro*^{10,19-21}. Esta diferença da potência dos efeitos dos fármacos citados acima pode ser explicada, em parte, pela diferença do coeficiente de partição desses medicamentos, bem como pela maior afinidade do TAC pela imunofilina FKBP12, do que a CsA pela ciclofilina²².

O TAC tem sido extensivamente estudado, não somente por sua habilidade em reduzir a rejeição de transplantes, mas também por suas propriedades antiinflamatórias. MAGARI et al (2004) demonstraram que o TAC reduziu os níveis de IL-6, no modelo de artrite induzida por colágeno, em ratos²³. O TAC também inibiu os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 liberadas pela ativação de células T, na artrite reumatóide, na dermatite de contato e em certas inflamações oculares refratárias aos tratamentos convencionais²⁴⁻²⁷.

Outros trabalhos demonstraram a utilização do TAC em outras doenças de caráter inflamatório crônico, como por exemplo, a asma brônquica²⁸. Também tem sido descrito o uso de TAC na miastenia gravis^{29,30}. Além disso, CORRIGAN et al (1996) justificaram o uso

do TAC em pacientes asmáticos, principalmente em pacientes com resistência refratária aos glicocorticóides³¹.

Estudos têm demonstrado ainda a ação neuroprotetora do TAC, em modelos de isquemia e reperfusão e hemorragia cerebral, em ratos^{32,33}. Considerando esta atividade neuroprotetora, vale a pena destacar que trabalhos têm demonstrado que os níveis de FKBP12 no cérebro de ratos são de 10 a 40 vezes mais altos que em outros tecidos²¹.

Apesar do TAC demonstrar uma série de efeitos antiinflamatórios em modelos animais e em doenças humanas, os mecanismos pelo qual este fármaco exerce seu efeito antiinflamatório ainda permanecem pouco esclarecidos.

1.3. O Processo Inflamatório

A Inflamação é um processo fisiológico, pelo qual os tecidos do corpo respondem a diferentes estímulos, sejam eles teciduais, infecciosos, químicos, imunológicos, entre outros³⁴. A resposta inflamatória ocorre em todos os organismos multicelulares e representam à evolução do sistema imunológico adaptativo ao longo dos tempos. Neste contexto, a inflamação pode ser vista como um processo chave de ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa, o que nos permite compreender a variedade de mediadores químicos e de células envolvidas no processo inflamatório e que promovem importantes alterações no organismo³⁵.

A inflamação pode ser caracterizada por cinco sinais cardinais, os quais são conhecidos desde os tempos antigos: rubor (vermelhidão), tumor (edema), calor, dor, e perda de função (*functio laesa*)³⁶. O reconhecimento dos quatro primeiros sinais foi atribuído a Celcius no primeiro século (d.c.). O quinto sinal foi adicionado à definição de inflamação por Galeno (130-200 d.c.).

O resultado de cada reação inflamatória pode ser benéfico ou prejudicial. Benéfico quando ocorre reparação de estruturas e funções com consequente manutenção da homeostasia tecidual³⁵. Prejudicial se a inflamação se tornar crônica. A resposta exacerbada ocorre quando a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e

sincronizada. Dessa forma, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem comprometer a homeostasia do organismo³⁷.

Didaticamente, a resposta inflamatória pode ser dividida em três fases distintas. Inicialmente existe uma fase aguda, de duração variável, onde ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas e posteriormente, ocorre à regeneração tecidual ou fibrose³⁸.

A primeira fase da reação inflamatória é reconhecida pela vasodilatação e é clinicamente caracterizada por calor e rubor. O propósito da resposta de vasodilatação é facilitar a distribuição local de mediadores solúveis e de células inflamatórias e envolve inicialmente arteríolas seguida pela abertura de redes microvasculares. A vasodilatação se deve a liberação de diferentes mediadores químicos: óxido nítrico (NO), cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-acéter, fração C5a do sistema complemento, prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α}) e substâncias liberadas localmente das terminações nervosas (taquicinininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP)^{39,40}.

A fase aguda é acompanhada pela migração de leucócitos e de outras células fagocitárias no local afetado (fase subaguda). Neutrófilos e outros leucócitos requerem fatores quimiotáticos para facilitar a migração para o local da injúria ou infecção. Dentre estes fatores quimiotáticos podemos citar produtos bacterianos, componentes do sistema complemento e citocinas (quimiocinas). Além disso, a migração de leucócitos ocorre através de interações específicas com o endotélio vascular. A captura de leucócitos, o rolamento, a adesão e a transmigração são mediadas por: 1) moléculas de adesão do tipo selectinas expressas em plaquetas (P-selectina), em leucócitos (L-selectina) e no endotélio (E-selectina), 2) moléculas de adesão do tipo integrinas expressas em linfócitos (LFA-1 – leukocyte function associated antigen) e em macrófagos (Mac-1 – macrophage-1 antigen) e 3) superfamília das imunoglobulinas: very low antigen (VLA-4), molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1)⁴¹. A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo³⁴.

Apesar do reconhecimento da inflamação a mais de dois mil anos, existe um novo interesse nesse assunto, gerado em parte pelo reconhecimento da participação da inflamação em várias doenças como arteriosclerose, câncer, asma brônquica, doença pulmonar obstrutiva crônica e em infecções, entre outras.

1.3.1 Células do Processo Inflamatório

1.3.1.1. Polimorfonucleares

Os polimorfonucleares (neutrófilos) são células fagocitárias que constituem a primeira linha de defesa do sistema imune inato. Além disso, são os mais abundantes leucócitos encontrados no sangue humano⁴². Estas células, de vida curta, são rapidamente recrutadas para o sítio de infecção pelo hospedeiro e/ou por componentes microbianos e se acumulam por horas no local da inflamação aguda.

Os polimorfonucleares se ligam e ingerem microrganismos por um processo conhecido como fagocitose, que tipicamente desencadeia a geração de radicais superóxido e outros derivados secundários de espécies reativas de oxigênio (ácido hipocloroso, radical hidroxil) e cloraminas. A seguir, ocorre a fusão de grânulos citoplasmáticos dos polimorfonucleares com vacúolos contendo patógenos e subsequentemente a morte do agente agressor⁴³.

Os grânulos citoplasmáticos presentes nos polimorfonucleares são gerados durante a diferenciação celular e são de dois tipos predominantes: grânulos azurófilos (primários - peroxidase-positivos) ou específicos (secundários e terciários – peroxidase-negativos). Os grânulos azurófilos são os primeiros a serem produzidos e contém uma grande quantidade de proteínas e peptídeos direcionados para a digestão e a morte de microrganismos. Estes contêm, dentre outros, a mieloperoxidase (MPO) e três predominantes serina proteases (proteinase-3, catepsina-G e elastase)⁴⁴. Além disso, os grânulos azurófilos contêm as defensinas, que são pequenas moléculas catiônicas que perfazem aproximadamente 5% do total de proteínas dos polimorfonucleares e também um potente peptídeo de ação bactericida

(BPI) que aumenta a permeabilidade vascular^{45,46}. Os grânulos azurófilos correspondem de 10 a 20% dos grânulos presentes nos polimorfonucleares maduros.

Os grânulos específicos podem ser subdivididos em específicos (secundários) e gelatinase (terciários) e são formados continuamente durante a hematogênese, desde a série mielóide até segmentados. Todavia, se visualizarmos do ponto de vista fisiológico, os grânulos específicos e a enzima gelatinase diferem significativamente em relação à composição protéica e suas propriedades⁴⁵.

A migração de leucócitos do sangue para o local de exposição do patógeno é o evento chave do processo de inflamação⁴⁷. O recrutamento de polimorfonucleares e de outras células para o sítio inflamatório permite que o organismo se defenda contra os microrganismos invasores. Porém, se os mecanismos regulatórios da inflamação estiverem ativados continuamente, ocorre lesão tecidual, decorrente principalmente da liberação das substâncias tóxicas dos polimorfonucleares ativados, incluindo proteases e espécies reativas de oxigênio⁴⁵.

1.3.1.2. Mononucleares

O sistema fagocítico mononuclear é composto por dois tipos de células com funções distintas: os monócitos e os macrófagos. Os macrófagos são monócitos teciduais em sua forma madura, cuja função é remover antígenos particulados e atuar como células apresentadoras de antígeno, internalizando e apresentando os antígenos aos linfócitos T⁴⁸.

Enquanto os polimorfonucleares são considerados células de vida curta (células kamikaze) e necessitam serem continuamente produzidas, as células mononucleares possuem vida longa e algumas podem se proliferar *in situ*. Os monócitos podem diferenciar-se em macrófagos ou células dendríticas (CDs), transformando-se então, em células teciduais⁴².

As células mononucleares ativadas têm sido correlacionadas com várias doenças inflamatórias. A aterosclerose é um exemplo pelo qual ocorre migração e a diferenciação de monócitos, sendo que este processo é dependente da liberação de proteína quimiotática de monócito-1 (MIP-1) e fator estimulante de colônia de macrófago (MGF) em células endoteliais e da musculatura lisa⁴⁹.

1.3.2. Enzimas do Processo Inflamatório

1.3.2.1. Mieloperoxidase

Os neutrófilos são células altamente especializadas para sua função primária, a fagocitose e a destruição de microrganismos. A invaginação da membrana celular dos neutrófilos promove a incorporação dos microrganismos na célula. Após esta etapa, ocorre a fusão do fagossoma com os grânulos intracelulares seguido do metabolismo oxidativo (“*burst*” respiratório), caracterizado por um intenso consumo de oxigênio com conseqüente formação de espécies reativas de oxigênio. Entre os sistemas antimicrobianos presentes nos grânulos encontra-se a mieloperoxidase⁵⁰.

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase abundante nos grânulos presentes nos neutrófilos e nos monócitos. Todavia, os monócitos contêm apenas um terço da MPO encontrada nos neutrófilos⁴⁴.

A MPO está apta a formar uma grande variedade de compostos. Após a conversão do oxigênio molecular em ânion superperóxido, promovido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual possui ação microbicida. A reação subsequente envolve a ligação da MPO com o peróxido de hidrogênio e sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso, o qual também possui intensa atividade microbicida^{44,51}.

Em algumas situações, A MPO e o peróxido de hidrogênio podem ser liberados para fora da célula. Isso aumenta o potencial de destruição do alvo extracelular, mas também pode promover destruição tecidual no sítio inflamatório. Além disso, a liberação do ácido hipocloroso leva a formação de espécies reativas de oxigênio que também possuem alto potencial de lesão no tecido⁴⁴.

1.3.3. Mediadores do Processo Inflamatório

1.3.3.1. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás e um radical livre que regula funções celulares em condições fisiológicas e patológicas⁵².

A atividade biológica do NO foi revelada em um artigo publicado por FURCHGOTT et al (1980), no qual descreveram um experimento *in vitro* observando-se o relaxamento do endotélio induzido por acetilcolina, em preparações de vasos sanguíneos⁵³. Todavia, essa propriedade atribuída a acetilcolina não foi observada quando o endotélio da musculatura lisa vascular foi deliberadamente removido. Estudos posteriores demonstraram que a acetilcolina e outros agentes como a bradicinina (BK), a histamina (HIST), a substância P (SP) e a 5-hidroxitriptamina liberavam uma substância denominada de fator relaxante derivado do endotélio, o qual era instável e estimulava a guanilato ciclase, a qual era inibida pelo azul de metileno^{52,54}. Em 1987, o NO foi identificado como o mediador indutor do relaxamento da musculatura lisa vascular dependente do endotélio⁵⁵.

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, o qual está presente em altas concentrações no sangue, no fluído extracelular e também em diferentes tipos de células. Uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS) promove a catálise dessa reação. Todavia, o processo de liberação do NO é o resultado de uma série de eventos oxidativos e redutores, envolvendo um grande número de cofatores⁵⁶.

Hoje são conhecidas três isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). As duas primeiras enzimas (também denominadas NOS I e NOS III) são constitutivas, produzem NO em baixas concentrações e sua ativação é dependente de cálcio⁵⁷. Já a iNOS libera grandes quantidades de NO (cerca de 20 vezes mais do que a produção da NOS constitutiva), é ativada por estímulos externos como, por exemplo, lipopolissacarídeos bacterianos e atinge um pico máximo de atividade 24 h após. A habilidade da iNOS em se ligar fortemente a calmodulina, mesmo em baixas concentrações de cálcio, explica o fato da iNOS gerar maiores quantidades de NO do que as outras enzimas⁵⁶.

O mecanismo primário para a regulação da expressão da iNOS ocorre pela indução da expressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) em vários órgãos, incluindo pulmão, via ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. Estímulos inflamatórios como lipopolissacarídeo e citocinas induzem a liberação do NO em vários tipos de células tais como

células endoteliais, da musculatura lisa vascular e da musculatura lisa de vasos arterioscleróticos, além de macrófagos^{58,59}.

Em estados fisiológicos, o NO atua funcionalmente como agente protetor, mas em condições de alta produção, pode contribuir para lesão tecidual. O NO tem sido implicado em algumas doenças como: artrite reumatóide, esclerose múltipla e sepsis, pelo qual o aumento da produção de NO promove lesão tecidual e contribui para a progressão dessas doenças⁶⁰⁻⁶². Portanto, estudos *in vitro* e *in vivo* de fármacos demonstrando a inibição de NO são importantes para a descoberta de novos medicamentos que atenuem a resposta inflamatória^{13,14}. Desta forma, a inibição do NO deve ser considerada um alvo terapêutico importante nas doenças inflamatórias que ocorrem em humanos⁶³.

1.3.3.2. Citocinas

Citocina é um termo aplicado a um grupo de proteínas ou glicoproteínas que servem como mensageiros químicos entre as células. Estas são produzidas durante a ativação da imunidade inata e adquirida, e estão envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação celular, reparo e remodelamento tecidual, e na regulação da resposta imune. Como mediadores solúveis, sua função pode ser autócrina, parácrina ou sistêmica^{64,65}.

As citocinas são classificadas em subgrupos tais, como: interleucinas, fatores de crescimento, quemocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda podem ser classificadas conforme sua atividade biológica em pró-inflamatórias (interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento transformante beta (TGF- β)) e antiinflamatórias: antagonista natural do receptor IL-1 β (IL-1Ra), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10)^{66,67}.

Em geral, as citocinas possuem função pleiotrópica, ou seja, a mesma citocina pode ter múltiplos efeitos em diferentes tipos de células. Além disso, a síntese de citocinas podem ser influenciada por outras citocinas liberadas simultaneamente da mesma célula ou de outras células alvo⁶⁴.

As citocinas se ligam a receptores específicos na célula alvo promovendo determinado efeito biológico. Estes receptores estão localizados na membrana celular

ou no citoplasma, e normalmente estão presentes em pequeno número. Porém, os receptores mostram uma alta afinidade pelos seus ligantes, o que promove os efeitos biológicos mesmo que apenas 5% destes receptores sejam ativados^{65,66}.

Em adição, várias células podem secretar citocinas. Dentre elas destacam-se os linfócitos T auxiliares (TH) que são divididos em duas subpopulações: células TH1 e TH2. As células TH1 secretam principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-2, enquanto as TH2 liberam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13^{68,69}. As células do tipo TH1 estão envolvidas na proteção contra agentes infecciosos, enquanto as do tipo TH2 regulam principalmente a produção de imunoglobulinas E, que são importantes na patogênese das doenças alérgicas⁷⁰⁻⁷².

As citocinas que estão envolvidas na inflamação são as chamadas proinflamatórias. Dentre estas citocinas destacam-se o TNF- α e a IL-1 β .

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e por células T⁷³. Mesmo em baixas concentrações, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão, em células endoteliais vasculares e estimula macrófagos e outras células a secretarem quemocinas⁷⁴. Outros estudos demonstraram que o TNF- α promoveu a secreção da quemocina para neutrófilos denominada IL-8/CXCL8⁶⁹. Além disso, o TNF- α é uma das principais citocinas associadas à artrite reumatóide. Hoje em dia, um novo fármaco a base de anticorpo monoclonal anti-TNF (Infliximab, Etanercept) associado a imunossupressores como metotrexato é utilizado no tratamento da artrite reumatóide⁷⁵. Outros trabalhos demonstraram que o TNF- α é um potente indutor da metaloproteinase-9 (proteína envolvida na angiogênese e metástase), em células hepáticas humanas⁷⁶.

Já a família da Interleucina-1 (IL-1) consiste de três proteínas estruturalmente relacionadas: IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra. A IL-1 α e a IL-1 β são agonistas e IL-1Ra é um antagonista natural específico do receptor para IL-1. A IL-1 se liga a dois tipos de receptores denominados I e II. Somente os receptores do tipo I são capazes de induzir a sinalização intracelular. Os receptores do tipo II se ligam a IL-1 circulante⁷⁷.

A IL-1 pode ser produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos/macrófagos, fibroblastos, células T, neutrófilos e células epiteliais das vias aéreas. O aumento da produção de IL-1 tem sido reportado em pacientes com infecções virais, bacterianas, leucemias, asma brônquica, pancreatite, doenças pulmonares, renais e outras⁷⁸⁻⁸².

Além disso, outras doenças de caráter inflamatório pelo qual ocorre o envolvimento da IL-1 β têm sido descritas como a artrite reumatóide, o infarto agudo do miocárdio e a neuroinflamação⁸³⁻⁸⁷.

Outra importante família de citocinas são as quemocinas, moléculas estruturalmente relacionadas que regulam o recrutamento e a migração de leucócitos para os sítios de inflamação e possuem importante papel como mediadores pró-inflamatórios^{88,89}. Estas citocinas são classificadas em 4 subfamílias: CX3C, CXC, CC e C. As quemocinas são produzidas praticamente por quase todas as células incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, eosinófilos, mastócitos, linfócitos B e células T supressoras (NK), entre outras⁹⁰.

1.3.3.3. Cininas

As cininas são um grupo de peptídeos formados endogenamente e que possuem como integrantes a bradicinina (BK), a lisil-bradicinina (lis-BK) ou calidina e seus metabólitos ativos: a des-Arg⁹-BK e a lis-des-Arg¹⁰-BK. Esses componentes, associados à cininogênios de alto e baixo peso molecular, além de enzimas que geram a BK e as cininases, formam o sistema cinina-caliceína^{91,92}.

Este sistema possui muitos componentes e pode ser subdividido em plasmático e tecidual. No plasma, a bradicinina é produzida a partir da ação de uma enzima chamada caliceína, que age sobre o cininogênio de alto peso molecular. A caliceína plasmática é sintetizada no fígado e circula no sangue como um precursor inativo, na forma de pré-caliceína. A conversão de pré-caliceína em caliceína é catalisada pelo fator Hageman (Fator XII da cascata de coagulação)^{93,94}.

Diferentemente da caliceína plasmática, a caliceína tecidual libera principalmente a lisil-bradicinina (Lis-BK), originada da proteólise do cininogênio de baixo peso molecular. Por meio da ação de aminopeptidases, a lis-BK é convertida em BK. Ao contrário da caliceína plasmática, as caliceínas teciduais são encontradas na forma ativa em vários órgãos e glândulas como pâncreas, rins e glândulas salivares^{95,96}.

Uma terceira cinina, a metionil-lisil-bradicinina (met-lis-BK) parece ser produzida em determinadas inflamações e é formada pela combinação de calicreína e elastase de neutrófilos⁹⁵.

As cininas exercem seus efeitos através da ativação principalmente de dois diferentes tipos de receptores denominados B₁ e B₂. Os receptores B₂ são constitutivamente expressos em uma variedade de tecidos, e possuem um papel importante em muitas condições patológicas como na resposta inflamatória aguda e dor^{91,97}. O receptor B₁ é expresso somente em determinadas situações como injúria tecidual e inflamação, principalmente de caráter crônico⁹⁸. Ambos os receptores são acoplados a proteína G⁹³.

A maioria das ações da BK e da lis-BK são mediadas por meio da ativação dos receptores B₂. Todavia, esses peptídeos possuem uma meia vida muito curta. A BK e a lis-BK são rapidamente degradados pelas enzimas carboxipeptidase N e M (cininase 1) e aminopeptidase, as quais são encontradas em tecidos e fluídos biológicos^{94,99}. A enzima cininase 1 remove o aminoácido Arg⁹ da região carboxi-terminal da bradicinina e da lis-BK dando origem aos metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e des-Arg⁹-lis-BK, respectivamente. As aminopeptidases agem sobre a lis-BK e a des-Arg⁹-lis-BK removendo o aminoácido Lys da região amino-terminal dando origem a bradicinina e a des-Arg⁹-BK, respectivamente^{99,100}.

Os metabólitos ativos formados pela degradação das cininas possuem afinidade principalmente pelos receptores B₁, e são ineficazes em ativar os receptores B₂.

Trabalhos têm demonstrado que a bradicinina estimula a liberação e age sinergicamente com várias citocinas, amplificando a resposta inflamatória. Mais especificamente, a bradicinina estimula a liberação de TNF- α e IL-1 β , em cultura de macrófagos¹⁰¹.

Tanto os receptores B₁ como os receptores B₂ estão envolvidos na resposta inflamatória, todavia, os receptores B₁ estão envolvidos no recrutamento de leucócitos para a área inflamada^{94,99}. Esta evidência pode ser corroborada por estudos realizados por PESQUERO et al (2000)¹⁰². Neste estudo, camundongos deficientes para o receptor B₁ da bradicinina, mostraram uma diminuição da resposta inflamatória (migração de leucócitos e exsudação) no modelo da pleurisia induzida por des-Arg⁹-bradicinina.

Em humanos, a bradicinina exerce diversos efeitos como a liberação de diversos mediadores da inflamação como os prostanóides de diversos tipos celulares, as citocinas (IL-

1b e TNF- α) de macrófagos, além do óxido nítrico liberado de células endoteliais vasculares^{103,104}.

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ para auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias crônicas^{105,106}.

1.3.3.4. Taquicininas

Em 1931, von Euler e Gaddum descreveram que uma substância não identificada extraída do cérebro e intestino de cavalos promovia efeitos hipotensivos e espasmogênicos em coelhos¹⁰⁷. Esta preparação foi denominada preparação P. Após alguns insucessos no isolamento desta substância de intestinos de cavalo, a substância P (SP) foi isolada de hipotálamo de bovinos e sua estrutura foi estabelecida em 1970, pelo grupo liderado por Chang e Leeman¹⁰⁸. Por muitos anos, acreditava-se que a única taquicininina de mamíferos era a SP. Já em 1983, foram descritos o isolamento de mais duas taquicinininas denominadas neuroquinina A e neuroquinina B¹⁰⁹.

As taquicinininas pertencem a uma família de neuropeptídeos que possuem em comum uma seqüência C-terminal, o qual é crucial para a interação com seus receptores. Todavia, as diferenças nas seqüências amino-terminais determinam a especificidade de cada taquicininina com cada subtipo de receptor. Os três membros clássicos da família das taquicinininas isoladas em mamíferos são: a substância P (SP), a neuroquinina A (NKA) e a neuroquinina B (NKB). A NKA ocorre também em duas formas: o neuropetídeo K e o neuropeptídeo- γ ¹¹⁰. Recentemente, com os estudos de biologia molecular, novos membros foram descobertos e incluem a Hemoquinina-1 (HK-1) e as endoquininas (EKA, EKB, EKC, EKD)¹¹¹.

Em mamíferos, as taquicinininas são derivadas de genes denominados preprotoquininas. Estes genes já foram clonados e denominados de: a) PPT-A que origina a substância P, a neurocinina A e os neuropeptídios γ e K, b) PPT-B que origina a neurocinina B^{112,113} e c) PPT-C que, por sua vez, origina a hemoquinina-1 e as endoquininas A-D¹¹⁴⁻¹¹⁶. Este último gene já foi identificado em várias espécies e origina, por exemplo, a hemoquinina-1 em camundongos e ratos¹¹⁶.

A atividade biológica das taquicininas depende da sua interação com seus receptores. Os receptores taquicinérgicos conhecidos são NK₁, NK₂ e NK₃. Estes receptores são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G^{117,118} e possuem uma grande homologia estrutural, refletindo dessa forma o mecanismo de ação comum das taquicininas. O receptor NK₁ possui alta afinidade pela SP, enquanto os receptores NK₂ e NK₃ possuem alta afinidade por NKA e NKB, respectivamente. Estudos têm demonstrado a presença de um quarto tipo de receptor denominado NK₄, também denominado NK_{3b} devido a sua homologia estrutural com o receptor NK₃¹¹⁹.

Em mamíferos, as taquicininas são consideradas neurotransmissores que agem de forma parácrina ou endócrina, bem como neuroimunomoduladores dos Sistemas Nervoso Central, Gastrointestinal e Cardiovascular¹¹⁸. As taquicininas apresentam vários efeitos biológicos que incluem: contração da musculatura lisa, hipotensão, inflamação neurogênica e envolvimento em processos inflamatórios, entre outros^{112,120}.

O papel das taquicininas em doenças humanas tem sido intensivamente estudado. SPRINGER et al (2005) demonstraram que o receptor NK1 e a SP são expressos em grande quantidade nas vias aéreas de humanos com doença pulmonar obstrutiva crônica (CPOD). Este fato demonstra que taquicininas têm um importante papel na regulação e na secreção de muco pelas células inflamatórias¹²¹. Níveis elevados de SP em fluido sinovial estão correlacionados com o aumento de citocinas sérica pró-inflamatórias em pacientes com artrite reumatóide¹²². Em um outro estudo, a SP potencializou o efeito de citocinas pró-inflamatórias, na expressão de VCAM-1, em sinoviócitos de pacientes com artrite reumatóide¹²³.

1.3.3.5. Aminas Vasoativas

As aminas vasoativas mais importantes são a histamina e a serotonina. Estes mediadores encontram-se em estoques formados previamente nas células. A histamina encontra-se principalmente em basófilos e mastócitos, e depois de liberada promove vários efeitos biológicos, via ativação de receptores histaminérgicos (H₁, H₂, H₃ ou H₄)¹²⁴.

A serotonina (5-HT), que é considerada um dos principais mediadores da dor e da inflamação, é produzida nas células enterocromafins da mucosa gastrointestinal e é absorvida pelas plaquetas, onde se encontra estocada¹²⁵.

A histamina é uma amina primária básica, sintetizada a partir da histidina pela ação da histidina descarboxilase e armazenada dentro de grânulos secretores¹²⁶. Em humanos, a histamina está armazenada em mastócitos e basófilos, células enterocromafins do trato gastrointestinal e nervos histaminérgicos no sistema nervoso central (SNC)¹²⁷. Além disso, por muitos anos têm se observado a presença de histamina em linfócitos, monócitos e plaquetas humanas¹²⁷.

Este mediador atua no recrutamento de neutrófilos em vários modelos de inflamação. Dentre estes estudos cita-se o de YAMASHIRO e colaboradores (2001) pelo qual demonstraram que a histamina foi capaz de induzir a quimiotaxia de leucócitos nas veias da retina de ratos quando administrada por via intraorbital¹²⁸.

1.4. Modelos de Inflamação

Esforços têm sido realizados no sentido de encontrar modelos experimentais e animais apropriados para cada tipo de reação inflamatória como asma brônquica, artrite reumatóide. Esta necessidade se deve ao fato que a maioria das reações inflamatórias apresentam características comuns, mas sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente. Protocolos experimentais, em que o processo inflamatório é induzido agudamente, têm sido utilizados para o estudo da participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares e ainda na seleção de fármacos/plantas com potencial atividade antiinflamatória.

Entre os métodos para o estudo do processo inflamatório e para a seleção de novos fármacos/plantas, citam-se: pleurisia, bolsa de ar, edema de pata, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo¹²⁹. No entanto, algumas técnicas apresentam limitações: dificuldades de manipulação durante a indução da inflamação e de quantificação dos parâmetros inflamatórios (edema, número e tipo de células envolvidas, extravasamento de proteínas, mediadores envolvidos).

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido, em ratos e mais tarde reproduzido em cobaias^{130,131}. Este modelo possibilita a avaliação do extravasamento de líquido, bem como a migração de células^{13,14,132} e ainda a participação de outros mediadores

como: citocinas, enzimas e outros mediadores químicos pró-inflamatórios induzidos por diversos agentes flogísticos¹³²⁻¹³⁸.

A intensidade e a duração da inflamação produzida por um agente flogístico dependerão da sua persistência no local e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares. Dentre os agentes flogísticos que podem ser utilizados destaca-se a carragenina, obtida de algas marinhas. Este agente induz uma resposta inflamatória aguda no modelo da pleurisia, em camundongos. Quatro horas após a administração da carragenina na cavidade pleural ocorre aumento da exsudação bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares¹³².

No modelo da pleurisia admite-se que o sítio primário da inflamação seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório induzido experimentalmente, ocorre acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudado. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou por aquelas que migram para o local do processo inflamatório.

A técnica da pleurisia possui vantagens em relação às outras técnicas já citadas anteriormente porque o volume de amostra coletado permite analisar e quantificar diversos parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação, mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico, entre outros), além da participação de enzimas como mieloperoxidase e adenosina-deaminase, sem a necessidade de recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem do modelo citado é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos podem ser estudados, como por exemplo, bradicinina, histamina ou substância P, os quais também são importantes agentes da resposta inflamatória.

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima, destacando sua utilidade, servindo tanto para o estudo da reação inflamatória como para a avaliação de fármacos com potenciais propriedades antiinflamatórias.

2 JUSTIFICATIVA

A asma brônquica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada por uma obstrução reversível do fluxo aéreo. Estima-se nos países do primeiro mundo que a incidência desta doença tem aumentado nos últimos anos. Associado a isso, tem-se observado aumento crescente da prevalência e severidade desta doença, e do número de pacientes que não conseguem controlar a doença por estratégias convencionais que incluem o uso de broncodilatadores e corticosteróides.

Além do aumento de pacientes resistentes ao tratamento com glicocorticóides orais, o uso contínuo e prolongado deste fármaco promove muitos efeitos indesejados tais como osteoporose, hipertensão e diabetes em alguns pacientes¹³⁹. Isso tem estimulado a busca contínua de novos fármacos para o tratamento desta patologia. Tratamentos alternativos têm sido baseados na utilização de fármacos imunossupressores disponíveis na clínica, como o metotrexato, a ciclosporina A e o tacrolimus.

Componentes distintos estão envolvidos na redução do calibre das vias aéreas de pacientes com asma brônquica: produção de secreção, contração da musculatura lisa e espessamento das paredes das vias aéreas. Além disso, muitos trabalhos demonstraram que a infiltração de células e a produção de citocinas pró-inflamatórias possuem papel importante na patogênese da asma brônquica. Esforços têm sido realizados na tentativa de melhor estudar a asma brônquica, tendo em vista que não existem modelos adequados que reproduzam esta doença em animais de laboratório. Do ponto de vista experimental, a manifestação destas diferentes fases do processo inflamatório pode ser estudada em animais de laboratório através da medida da resistência das vias aéreas ou do influxo de células inflamatórias para a luz brônquica pela técnica do lavado brônquico após exposição inalatória ou da pleurisia induzida por diferentes compostos ou antígenos.

Apesar de trabalhos demonstrarem o uso do tacrolimus no tratamento da asma brônquica e em outras doenças como a artrite reumatóide, o mecanismo de ação antiinflamatória deste fármaco ainda está pouco esclarecido. Desta forma, o melhor entendimento do mecanismo de ação antiinflamatória do tacrolimus contribuirá para que este

fármaco possa ser utilizado em diversas doenças, principalmente aquelas de caráter inflamatório crônico.

3 OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito antiinflamatório do imunossupressor tacrolimus na resposta inflamatória induzida por diferentes agentes flogísticos (carragenina, bradicinina, histamina ou substância P), no modelo de pleurisia, em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do fármaco imunossupressor tacrolimus administrado por via intraperitoneal (i.p.) ou via oral (v.o.) sobre a migração dos leucócitos (polimorfonucleares e monócitos), no lavado da cavidade pleural e no sangue de animais tratados com carragenina;
- Investigar o efeito deste fármaco sobre a atividade da mieloperoxidase e os níveis de nitrito/nitrato obtidos no lavado da cavidade pleural 4 h após a administração da carragenina;
- Estudar o mecanismo de ação antiinflamatória do fármaco anteriormente citado, analisando-se o efeito deste sobre os níveis de: fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1-beta, quemocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago-2 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos;
- Investigar se o tacrolimus inibe indiretamente outros mediadores da inflamação (bradicinina, histamina e substância P) estudando-se o efeito deste fármaco sobre a migração dos leucócitos, no lavado pleural de animais com inflamação induzida por estes agentes flogísticos.

4 MÉTODO

4.1. Obtenção e Preparação do Fármaco (tacrolimus)

O fármaco utilizado (tacrolimus) foi adquirido por intermédio da empresa Jansen-cilag na forma de cápsulas na concentração de 1 mg de princípio ativo.

Para a preparação das diluições do fármaco empregadas no estudo, foi utilizado soro fisiológico ou salina (NaCl 0,9%) e quando necessário adicionou-se a esta solução 10 a 20 µl de tween 20. Para melhor solubilização do tacrolimus, as diluições foram incubadas em banho maria 37°C por 20 minutos e após submetidas a agitação em vortex. Todas as diluições foram realizadas imediatamente antes da realização dos experimentos.

4.2. Fármacos e Reagentes

Neste estudo utilizaram-se as seguintes substâncias e reagentes: carragenina (grau IV), bradicinina, histamina, substância P, orto-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S) (Sigma Chemical Co., St. Louis, CO, EUA), *Escherichia coli* (E.C. ATCC 25922) (American Type of Culture Collection, Virgínia, EUA), dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), captopril (Ranbaxy Laboratories Ltd., Dewas Madhya Pradesh, Índia), türk, May-Grunwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), sulfato de zinco (ZnSO₄), fosfato de sódio (NaH₂PO₄), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30%), fosfato de sódio monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (Na₂HPO₄.12H₂O) (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), azida sódica (Riedel-de Haën, Alemanha), formato de amônio (CH₃NO₂) (Acros-Organics, New Jersey, EUA), nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻) Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂)

(Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio (NaOH), fenol (C₆H₅OH) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), sulfato de amônio (NH₃SO₄) (Synth, Diadema, SP, Brasil), nitroprussiato de sódio (C₅FeN₅Na₂O.2H₂O), ácido fosfórico (H₃PO₄) (Nuclear, Diadema, SP, Brasil), reagentes de Elisa contendo anticorpo monoclonal de coelho anti-fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) de ratos (BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA), reagentes de Elisa contendo anticorpo monoclonal de coelho anti-interleucina 1 beta (IL-1 β) de rato, reagentes de Elisa contendo anticorpo monoclonal de coelho anti-quemocina de neutrófilos (KC) de camundongo, reagentes de Elisa contendo anticorpo monoclonal de coelho anti-proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) de camundongos (IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka-city, Gunma, Japan). Outros sais e reagentes de grau de pureza analítica foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

4.3. Animais

Em nosso estudo foram utilizados camundongos albinos suíços com 1 a 2 meses de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18-25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro (luz natural) e acondicionados em gaiolas de plástico (40 x 32 cm), sob temperatura ambiente (média de 25°C), com livre acesso à água e a ração (dieta comercial).

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório¹⁴⁰ e normas estabelecidas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número: 281/CEUA e cadastro número: 23080.0008802/2004-52/UFSC) (Anexo 1).

4.4. Procedimento Anestésico

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a coleta de amostra de sangue por punção ocular para avaliação do hemograma.

4.5. Eutanásia dos Animais

Os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital. A metodologia de pleurisia inviabiliza a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, pois tal procedimento pode provocar sangramento na cavidade pleural.

4.6. Procedimentos

4.6.1. Modelo de Inflamação Utilizado

- ***Pleurisia induzida pela carragenina.***

No dia dos experimentos, os animais foram separados e colocados em caixas de acordo com cada protocolo experimental. O agente flogístico (carragenina) foi preparado na concentração de 1% (Cg 1%), utilizando-se soro fisiológico (NaCl 0,9%) como diluente, aproximadamente 30 min antes do procedimento. Para a indução da pleurisia os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno. De acordo com o protocolo experimental, transcorridos 4 h após a administração do agente flogístico, os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital, fixados em mesa cirúrgica, em

declive de 30° a 45°, onde foi feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, com auxílio de pipeta automática, a cavidade pleural foi lavada de maneira seqüencial utilizando-se duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada heparinizada (PBS: pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM, tampão fosfato 10 mM e heparina 20 UI/ml)^{13, 132,137, 138}.

As amostras coletadas foram então destinadas à avaliação de diversos parâmetros inflamatórios: migração leucocitária, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de nitrito e nítrito (NO^x), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2).

Todos os experimentos foram acompanhados por um grupo controle negativo (animais tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%) ou o veículo estéril de diluição do fármaco), administrados por via intrapleural (i.pl.), grupo controle positivo (animais tratados com Cg 1%, i.pl.) e grupo controle experimental do fármaco com efeito antiinflamatório (animais tratados com dexametasona 0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da pleurisia com Cg 1%).

- ***Pleurisia induzida por outros agentes flogísticos.***

Em diferentes grupos de animais, a pleurisia foi induzida utilizando-se bradicinina, histamina ou substância P como agentes flogísticos. Para a realização destes experimentos, seguiu-se o mesmo protocolo experimental da pleurisia induzida pela carragenina. Os agentes flogísticos foram utilizados nas seguintes concentrações: bradicinina (BK: 10 nmol/cav.), substância P (SP: 20 nmol/cav.) e histamina (HIST: 100 μ g/cav.)^{133,135,136}.

Na pleurisia induzida por BK, os animais foram tratados previamente com captopril (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da aplicação de BK para evitar a ação das enzimas quininas sobre a BK¹⁴¹.

Os parâmetros avaliados foram: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares, 4 h após a indução da inflamação.

4.6.2. Técnicas Utilizadas

4.6.2.1. Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade pleural e no sangue total

Para a avaliação do número total de leucócitos presentes no lavado pleural, alíquotas de diferentes amostras (20 μ l) foram diluídas na proporção de 1:20 em líquido de Turk e deixadas em repouso por 5 minutos. A seguir, com auxílio de uma pipeta automática, as amostras foram colocadas em câmara de Neubauer e a contagem foi realizada utilizando-se microscópio ótico comum em aumento de 400 vezes.

Para a contagem diferencial, 50 μ L das alíquotas dos lavados pleural foram utilizados para a confecção dos esfregaços celulares em citocentrífuga (Cytopro® citocentrífuga modelo: 7620, Wescor, Logan, Utah, EUA) e corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. Amostras contendo leucócitos acima de $2,0 \times 10^6$ foram diluídas em soro fisiológico na proporção de 1:5 a 1:10 antes de serem colocadas na citocentrífuga. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada também em microscópio ótico comum, em objetiva de imersão (100 x), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células $\times 10^6$.

Para avaliação do hemograma, os animais foram previamente anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg). A seguir, a coleta do sangue foi realizada por punção ocular utilizando-se pipeta Pausteur. O sangue coletado foi imediatamente transferido para tubos de vidro contendo o anticoagulante etileno diamino tetracético (EDTA). A seguir, realizou-se imediatamente a contagem total de leucócitos em aparelho automatizado de hematologia (Marca ABX modelo pentra 60). Para contagem diferencial de leucócitos, foram confeccionados esfregaços sanguíneos que após secagem, foram corados de acordo com a metodologia descrita abaixo. A contagem diferencial foi realizada em microscópio ótico comum, em objetiva de imersão (100 x), contando-se 100 células por lâmina. 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-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa).

As lâminas contendo o sedimento do lavado pleural foram centrifugadas utilizando-se citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, E.U.A.) e colocadas em posição horizontal, em suporte de coloração apropriado. Após a secagem destas lâminas, 1 mL do corante May-Grünwald foi adicionado e mantido em contato com o sedimento fixado na lâmina por 2 minutos. A seguir adicionou-se água destilada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta com capacidade de 1 mL. Após 3 min de incubação, o corante foi retirado e adicionou-se 1 mL de corante Giemsa (diluído 1:20, em água destilada) sobre a lâmina e aguardou-se 15 min. A seguir, o corante foi escorrido e as lâminas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente.

Os resultados foram expressos em número total de polimorfonucleares ou de mononucleares ($\times 10^6$).

4.6.2.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no lavado pleural

Neste grupo de experimentos, imediatamente após o sacrifício dos animais, amostras do lavado pleural de camundongos injetados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), tratados com carragenina (1%), tacrolimus (i.p. ou v.o.) ou dexametasona (5 mg/kg, i.p.), foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação da atividade da mieloperoxidase. Volumes de 40 μ L do lavado ou do padrão (mieloperoxidase de neutrófilos humanos (0,7-140 mU/mL)) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360 μ L de sistema de incubação (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica (1%). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50 x g, por 5 min) e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em leitor de Elisa (Organon- Technica, Roseland, New Jersey, E.U.A.). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/mL) também tiveram

suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta¹⁴².

4.6.2.3. Determinação dos níveis de nitrito e nitrato no lavado pleural

O óxido nítrico foi quantificado pela formação de seus metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando-se a reação de Griess^{143,144}. As amostras do lavado da cavidade pleural de camundongos tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), carragenina, tacrolimus ou dexametasona foram coletadas, armazenadas em frascos de plástico com capacidade de 1,5 ml e estocadas em freezer a -20°C . No dia dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Após o descongelamento, 300 μL de cada amostra foram separadas em novos frascos para a realização da desproteínização. Para cada amostra, foram adicionados 20 μL de solução de sulfato de zinco (20%) e incubadas em geladeira por 60 minutos. As amostras, então, foram centrifugadas (10.000 r.p.m. por 15 minutos) e o resultado final desta primeira etapa foi à obtenção de um sobrenadante límpido. A seguir, 200 μL deste sobrenadante foram misturados em uma solução contendo formato de amônio (20 μL), fosfato de sódio (20 μL) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922) (20 μL) diluída (1:10) em tampão PBS (pH 7,2). A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C e a seguir centrifugada (3.000 r.p.m., por 10 min). Cerca de 100 μL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde o mesmo volume de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (peso/volume), ácido fosfórico (5%) (vol/vol) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (peso/volume) foi adicionado e incubado durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em leitor de Elisa (Organon -Tecknica, Roseland, New Jersey, E.U.A.) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato, em μM , com auxílio da equação da reta.

4.6.2.4. Determinação dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) no lavado pleural.

As seguintes citocinas foram quantificadas: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) nos lavados pleural utilizando reagentes de Elisa. As amostras dos lavados da cavidade pleural foram coletadas e as análises processadas de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação de TNF- α foi realizada incubando 50 μ L de cada amostra com 50 μ L de solução diluente por 2 h à temperatura ambiente. Após este período a placa foi lavada com solução detergente contendo 0,02% timerosal, em lavadora de Elisa (Organon-Teknika, Washer 430, New Jersey, EUA). A seguir, anticorpo monoclonal de coelho anti-TNF- α de ratos (100 μ L) foi adicionado e incubado por 1 h a temperatura ambiente. A placa foi lavada com a mesma solução detergente. Após, 100 microlitos de reagente enzimático (avidin-peroxidase com 0,01% timerosal) foi adicionado e a placa incubada por 30 min a temperatura ambiente. Novamente procedeu-se a lavagem da placa utilizando-se o detergente. Finalmente 100 μ L de substrato enzimático (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, TMB) foi adicionado na placa de Elisa e incubado por 30 min a temperatura ambiente. A seguir, 100 μ L de solução bloqueadora de reação enzimática (H₃PO₄ 1M) foi adicionada com a finalidade de proceder a leitura. Quando necessário, as amostras dos animais do grupo controle positivo (animais tratados com Cg 1%) ou dos animais tratados com tacrolimus ou dexametasona foram diluídas previamente (1:3) em solução diluente (salina tamponada contendo 1% soro albumina bovina e 0,05% de Tween 20).

Para as dosagens de IL-1 β , KC e MIP-2 procedeu-se da seguinte maneira: Em diferentes placas Takatsy Sever foram adicionadas 100 μ L de cada amostra em cada poço de reação e após foram incubadas por 1 h a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados com solução tampão de lavagem (tampão fosfato contendo 0,05% de Tween 20) em lavadora de Elisa (Organon-Teknika, Washer 430, New Jersey, EUA). Então, adicionou-se 100 μ L dos conjugados enzimáticos (anticorpo monoclonal de coelho anti-IL-1 β para rato ou anticorpo monoclonal de coelho anti-KC de camundongo ou anticorpo monoclonal de coelho anti-MIP-

2 de camundongo) para determinação de IL-1 β , KC ou MIP-2, respectivamente. A seguir incubou-se a mistura por 30 min a 4°C. Novamente a placa foi lavada utilizando-se tampão de lavagem. A seguir, adicionou-se substrato enzimático (TMB, 100 μ L) em cada poço e incubou-se à temperatura ambiente por 30 min. A seguir, adicionou-se 100 μ L da solução bloqueadora de reação enzimática (H₂SO₄ 1N) em cada poço e a leitura foi realizada em 450 nm. Quando necessário as amostras dos controles ou dos animais tratados com tacrolimus ou dexametasona foram diluídas (1:7) em solução diluente (salina tamponada contendo 1% de soro albumina bovina e 0,05% de Tween 20).

Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, TNF- α (31,3-2000 pg/mL), IL-1 β (100-6400 pg/mL), KC (23,44-1500 pg/mL) e MIP-2 (1-64 pg/mL), também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. Os valores de citocinas (TNF- α , IL-1 β , KC e MIP-2) foram expressos em pg/mL.

As leituras de todas citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) a 450 nm.

Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaios observados nos reagentes de Elisa foram: CV intra: TNF- α =7,83 \pm 0,90%, IL-1 β = 6,20 \pm 0,40%, KC = 9,67 \pm 0,96% e MIP-2 = 10,87 \pm 5,78%; CV Inter: TNF- α = 9,56 \pm 2,08%, IL-1 β = 5,10 \pm 0,57%, KC = 4,10 \pm 0,94% e MIP-2 = 4,87 \pm 0,90%. As sensibilidades identificadas nos kits de ELISA foram: TNF- α = 5 pg/mL, IL-1 β = 1,67 pg/mL, KC = 1,27 pg/mL e MIP-2= 0,36 pg/mL.

4.6.3. Protocolo Experimental

4.6.3.1. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

Inicialmente foram realizadas curvas dose-resposta, pelo qual diferentes grupos de animais foram tratados por via intraperitoneal ou por via oral com diferentes doses de TAC

(0,5 a 1,5 mg/kg, i.p. ou 1 a 10 mg/kg, v.o.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com carragenina (1%).

Após a escolha da melhor dose que inibiu a migração de leucócitos, avaliou-se o perfil temporal do TAC administrado previamente em diferentes períodos de tempo. Desta forma, diferentes grupos de animais foram tratados previamente com TAC (i.p. ou v.o.) em diferentes períodos de tempo (0,5 a 72 h) antes da indução da pleurisia. O lavado pleural foi obtido 4 h após a indução da inflamação. A análise dos leucócitos e exudação foram realizadas conforme descrito no item 4.6.2.1.

4.6.3.2. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia induzida por carragenina

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito do TAC sobre os níveis de leucócitos sanguíneos de camundongos com pleurisia. Dessa forma, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) com diferentes doses de TAC (0,5 a 1,5 mg/kg, i.p. ou 1 a 10 mg/kg, v.o.). Transcorridas 4 h após a indução da inflamação com carragenina, os animais foram anestesiados com pentobarbital (25 mg/kg) e amostras de sangue total foram coletadas por punção ocular. A análise do hemograma dos camundongos foi realizada segundo os procedimentos descritos no item 4.6.2.1.

4.6.3.3. Efeito do tacrolimus sobre a atividade da mieloperoxidase e os níveis de nitrato/nitrito na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito do TAC sobre a atividade da MPO e os níveis de NO^x , no lavado da cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida pela Cg. O Tacrolimus foi administrado na concentração de 1 mg/kg (i.p.) ou 10 mg/kg (v.o.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com Cg (1%) e após 4 h os animais foram sacrificados e as análises realizadas^{136,139}. As análises da atividade da MPO e os níveis de NO^x foram realizadas segundo as metodologias descritas nos itens 4.6.2.2 e 4.6.2.3, respectivamente.

4.6.3.4. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia de induzia por carragenina

Neste protocolo experimental, o efeito do TAC sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , KC e MIP-2) foi investigado no lavado pleural de camundongos inflamados. Desta forma, o TAC foi administrado na concentração de 1 mg/kg (i.p) ou 10 mg/kg (v.o.) 0,5 h antes da indução da pleurisia com Cg 1%. Após 4 h, os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital e os lavados pleurais obtidos foram imediatamente encaminhados para a quantificação das citocinas pelo método de enzimaímmunoensaio. As análises das citocinas TNF- α , IL-1 β , KC e MIP-2 foram realizadas segundo as metodologias descritas no item 4.6.2.4.

4.6.3.5. Efeito do tacrolimus sobre a migração de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por bradicinina, histamina ou substância P

Neste protocolo experimental, investigou-se o efeito do TAC sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos. Para isso, diferentes grupos de animais foram tratados com TAC (1 mg/kg, i.p. ou 10 mg/kg, v.o.) 0,5 h antes da indução da pleurisia. Para indução da inflamação foram utilizados diferentes agentes flogísticos (BK, HIST ou SP) e a migração de leucócitos foi analisada no lavado pleural obtido 4 h após a pleurisia. As análises de leucócitos foram realizadas conforme descrito no item 4.6.2.1.

4.7. Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (migração celular, atividade da MPO, níveis de NO^x, TNF- α , IL-1 β , KC e MIP-2) foram expressos através da média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos estudados foram realizadas utilizando-se teste de ANOVA (Newmann-Kauls), complementado pelo teste de Dunnett. Quando necessário utilizou-se o teste “t” de Student

(não-pareado). Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

Para a avaliação da atividade antiinflamatória do tacrolimus foram utilizadas duas vias de administração: intraperitoneal e oral. Desta forma, os resultados estão divididos em duas seções. Primeiramente são demonstrados os resultados obtidos por via intraperitoneal e posteriormente os resultados obtidos por via oral.

5.1. Tacrolimus Administrado por Via Intraperitoneal

5.1.1. Efeito do tacrolimus sobre a migração de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina

Neste protocolo experimental, foram avaliadas a curva dose-resposta e o perfil temporal do fármaco. O TAC, quando administrado na dose de 1 mg/kg (i.p.) 0,5 h antes da pleurisia induzida pela Cg 4 h, foi efetivo em atenuar significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais com pleurisia quando comparados ao grupo-controle (animais tratados com Cg) (Sal: $1,04 \pm 0,07$; Cg: $5,57 \pm 0,27$; TAC 1 mg/kg: $3,84 \pm 0,26$ ($P < 0,01$) (Figura 1A). Essa redução de leucócitos foi devido a atenuação da migração de polimorfonucleares (Sal: $0,11 \pm 0,01$; Cg: $4,77 \pm 0,28$; TAC 1 mg/kg: $3,14 \pm 0,24$) ($P < 0,01$) (Figura 1B). Nessa mesma concentração, o TAC não alterou os níveis de mononucleares ($P > 0,05$) (Figura 1C).

Em relação ao perfil temporal, o TAC atenuou significativamente a migração de leucócitos quando administrado até 24 h antes da indução da inflamação (Sal: $1,05 \pm 0,07$; Cg: $5,51 \pm 0,28$; TAC 2 h: $3,04 \pm 0,44$ TAC 4 h: $3,61 \pm 0,85$; TAC 24 h: $4,10 \pm 0,31$ ($P < 0,01$) (Figura 2A). Essa atenuação ocorreu às custas de polimorfonucleares (Sal: $0,12 \pm 0,02$; Cg: $4,73 \pm 0,29$;

TAC 2 h: $2,12 \pm 0,19$ TAC 4 h: $2,91 \pm 0,76$; TAC 24 h: $3,22 \pm 0,33$ ($P < 0,01$) (Figura 2B). Não se observou atenuação significativa na migração de mononucleares ($P > 0,05$) (Figura 2C).

A dexametasona (DEX) por ser um medicamento antiinflamatório esteroidal e reduzir grande parte dos parâmetros inflamatórios avaliados foi utilizada também como controle no experimento. Este fármaco atenuou significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais com pleurisia quando comparados ao grupo controle positivo ($\times 10^6$) (Sal: $1,04 \pm 0,07$; Cg: $5,51 \pm 0,28$; DEX 0,5 mg/kg: $1,98 \pm 0,56$) ($P < 0,01$) (Figuras 1A e 2A), sendo que esta atenuação ocorreu às custas de PMN ($\times 10^6$) (Sal: $0,11 \pm 0,01$; Cg: $4,73 \pm 0,29$; DEX 0,5 mg/kg: $1,41 \pm 0,19$) ($P < 0,01$) (Figuras 1B e 2B). Os percentuais de atenuação dos parâmetros estudados: leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares estão listados na tabela 1.

TABELA 1 - Valores percentuais de atenuação dos parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares em animais tratados com tacrolimus (1 mg/kg, i.p., 0,5 a 72 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) antes da indução da pleurisia por carragenina, em camundongos

Fármaco mg/kg i.p./h	Leucócitos totais (% de atenuação)	PMN (% de atenuação)	MN (% de atenuação)
TAC 1, 0,5 h	$31,1 \pm 4,6^{**}$	$33,9 \pm 4,9^{**}$	--
TAC 1, 02 h	$44,8 \pm 8,0^{**}$	$55,1 \pm 4,1^{**}$	--
TAC 1, 04 h	$34,4 \pm 15,4^{**}$	$38,5 \pm 16,0^{**}$	--
TAC 1, 24 h	$25,6 \pm 5,6^{**}$	$31,8 \pm 6,9^{**}$	--
TAC 1, 48 h	--	--	--
TAC 1, 72 h	--	--	--
DEX 0,5	$64,5 \pm 5,8^{**}$	$68,1 \pm 4,2^{**}$	--

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 4 a 6 animais. $** P < 0,01$ representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. PMN: polimorfonucleares; MN: mononucleares; DEX: dexametasona.

5.1.2. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

A análise do hemograma revelou que os camundongos tratados previamente com tacrolimus (0,5 a 1,5 mg/kg, i.p.) não apresentaram redução nos níveis de leucócitos no sangue ($\times 10^6$) ($P > 0,05$) (Fig. 3).

A DEX, por sua vez, inibiu os níveis de leucócitos sanguíneos ($\times 10^6$) (Sal: $3,9 \pm 0,36$; Cg: $4,2 \pm 0,16$; DEX 0,5 mg/kg: $1,9 \pm 0,46$) ($P < 0,01$), e os mononucleares (Sal: $3,4 \pm 0,32$; Cg: $3,6 \pm 0,15$; DEX 0,5 mg/kg: $1,6 \pm 0,38$) ($P < 0,01$) (Figura 3).

5.1.3. Efeito do tacrolimus sobre a atividade da mieloperoxidase e os níveis de nitrato/nitrito na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina

O TAC (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da Cg reduziu de forma significativa a atividade de MPO (mU/mL) (Sal: $28,9 \pm 4,23$; Cg: $301,1 \pm 42,5$; TAC 1 mg/kg: $148,5 \pm 19,0$) ($P < 0,01$) (Figura 4A). Todavia, o TAC 1 mg/kg não reduziu de forma significativa os níveis de NO^x (μM) ($P > 0,05$) (Figura 4B). Já a DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) reduziu de forma significativa a atividade de MPO (mU/mL) (Sal: $28,9 \pm 4,2$; Cg: $301,1 \pm 42,5$; DEX 0,5 mg/kg: $167,6 \pm 7,9$) ($P < 0,01$) (Figura 4A) e os níveis de NO^x (μM) (Sal $0,98 \pm 0,49$; Cg: $23,19 \pm 2,41$; DEX 0,5 mg/kg: $11,55 \pm 1,26$) ($P < 0,01$) (Figura 4B). Os percentuais de redução dos parâmetros inflamatórios: MPO e NO^x estão listados na tabela 2.

TABELA 2 - Valores percentuais de redução da atividade da mieloperoxidase e dos níveis de nitrato/nitrito em animais tratados com tacrolimus (1 mg/kg, i.p., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. 0,5 h), no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

Fármaco (mg/kg, i.p., 0,5 h)	Mieloperoxidase (% de redução)	Nitrato/nitrito (% de redução)
TAC 1mg/kg	$50,7 \pm 6,3^{**}$	--
DEX 0,5	$44,3 \pm 2,6^{**}$	$51,6 \pm 4,0^{**}$

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 4 a 6 animais. $^{**} P < 0,01$ representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. TAC: tacrolimus; DEX: dexametasona.

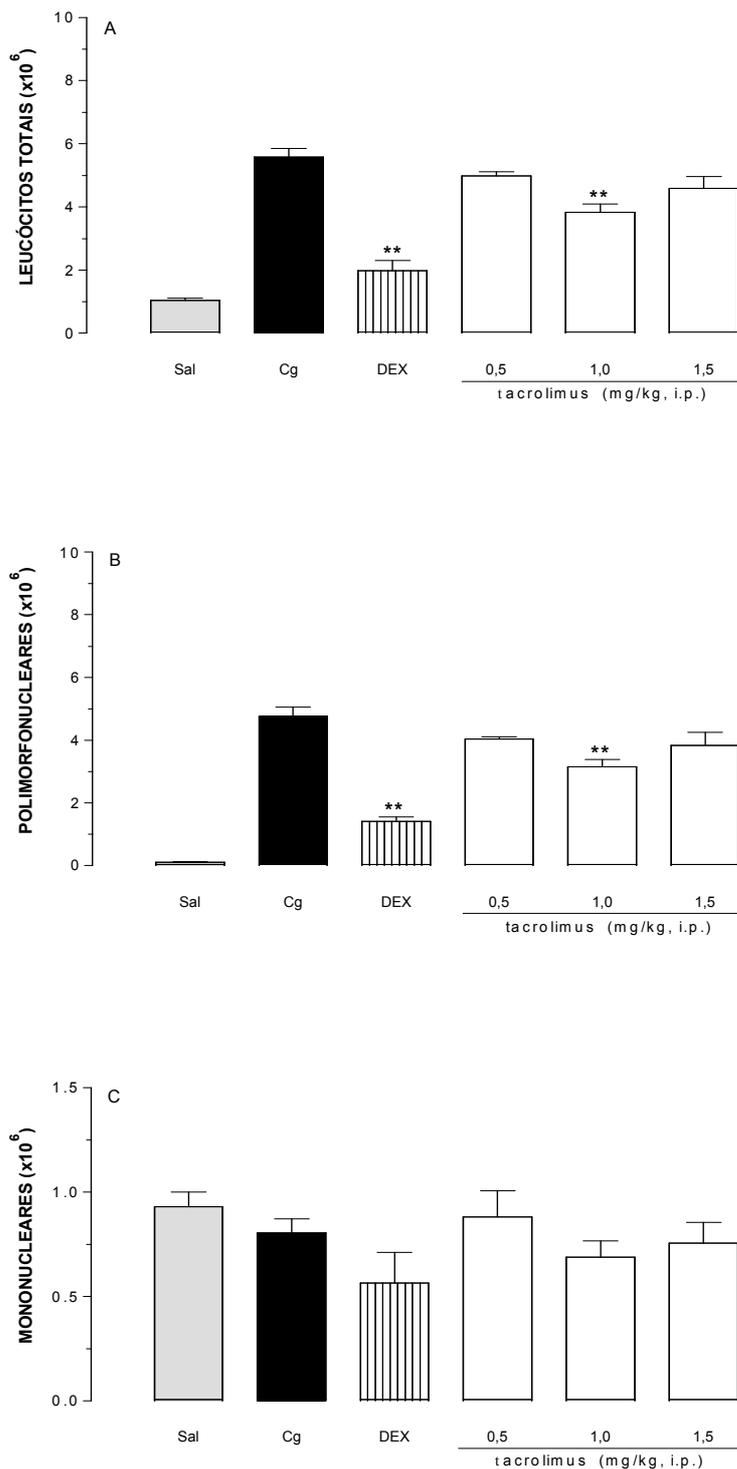


Figura 1 - Efeito de diferentes doses de tacrolimus (0,5 a 1,5 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** $P < 0,01$ representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

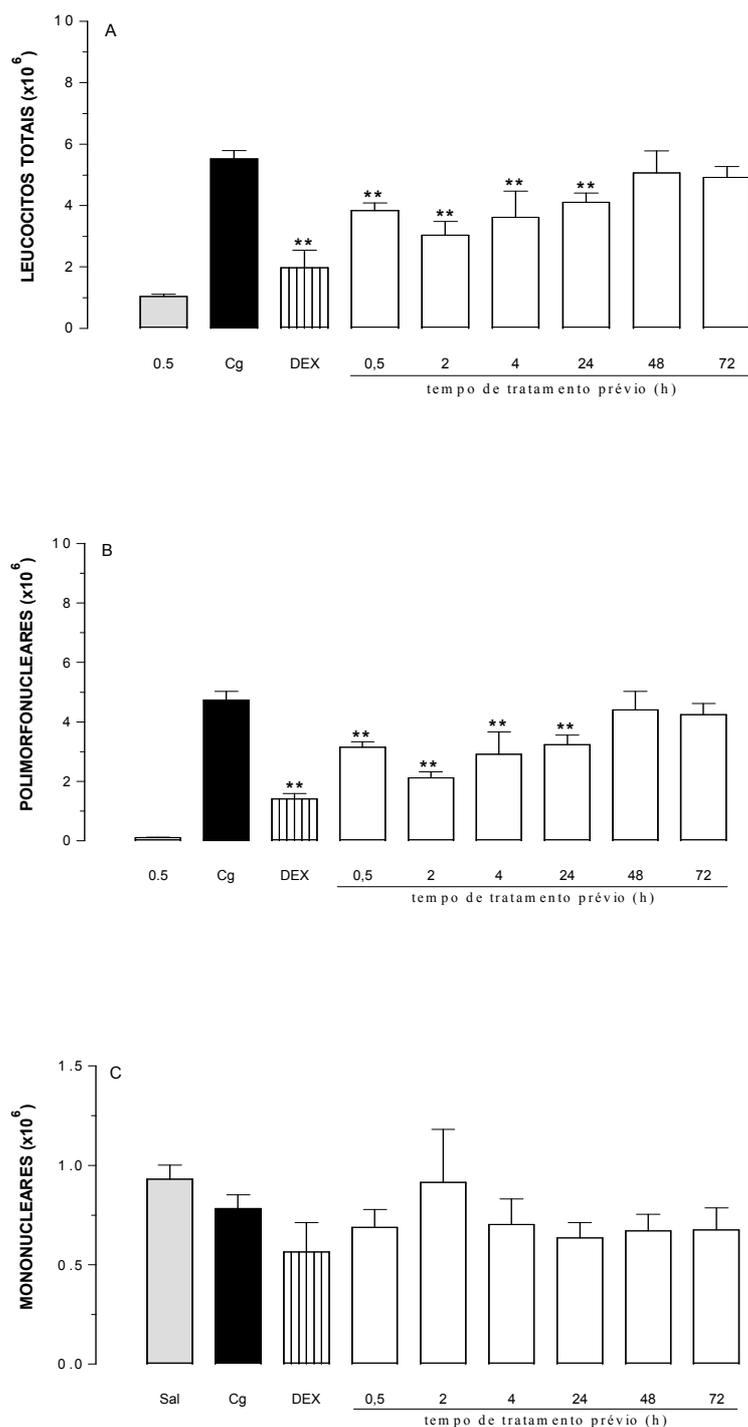


Figura 2 - Efeito do tacrolimus (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 - 72 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 3 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

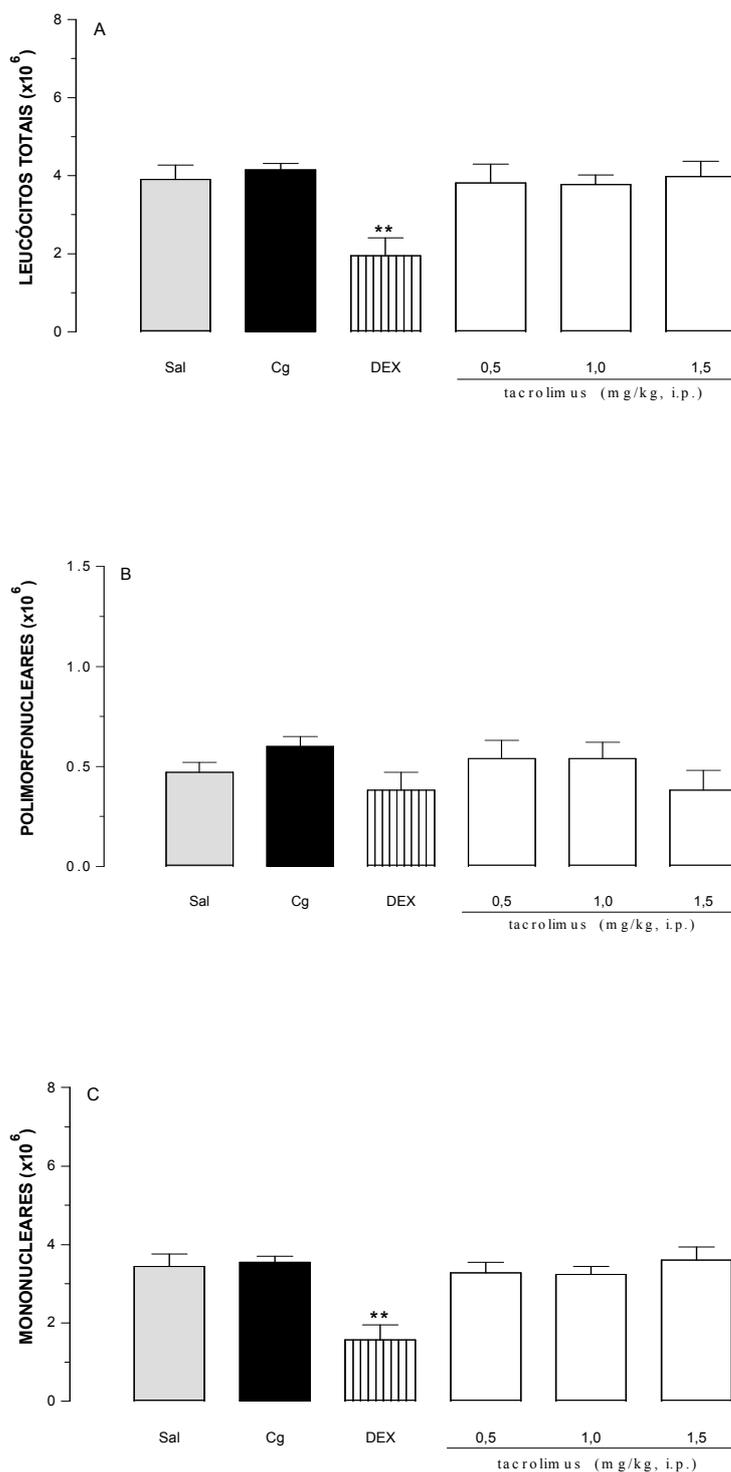


Figura 3 - Efeito de diferentes doses de tacrolimus (0,5 – 1,5 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). sanguíneos. Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** $P < 0,01$ representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

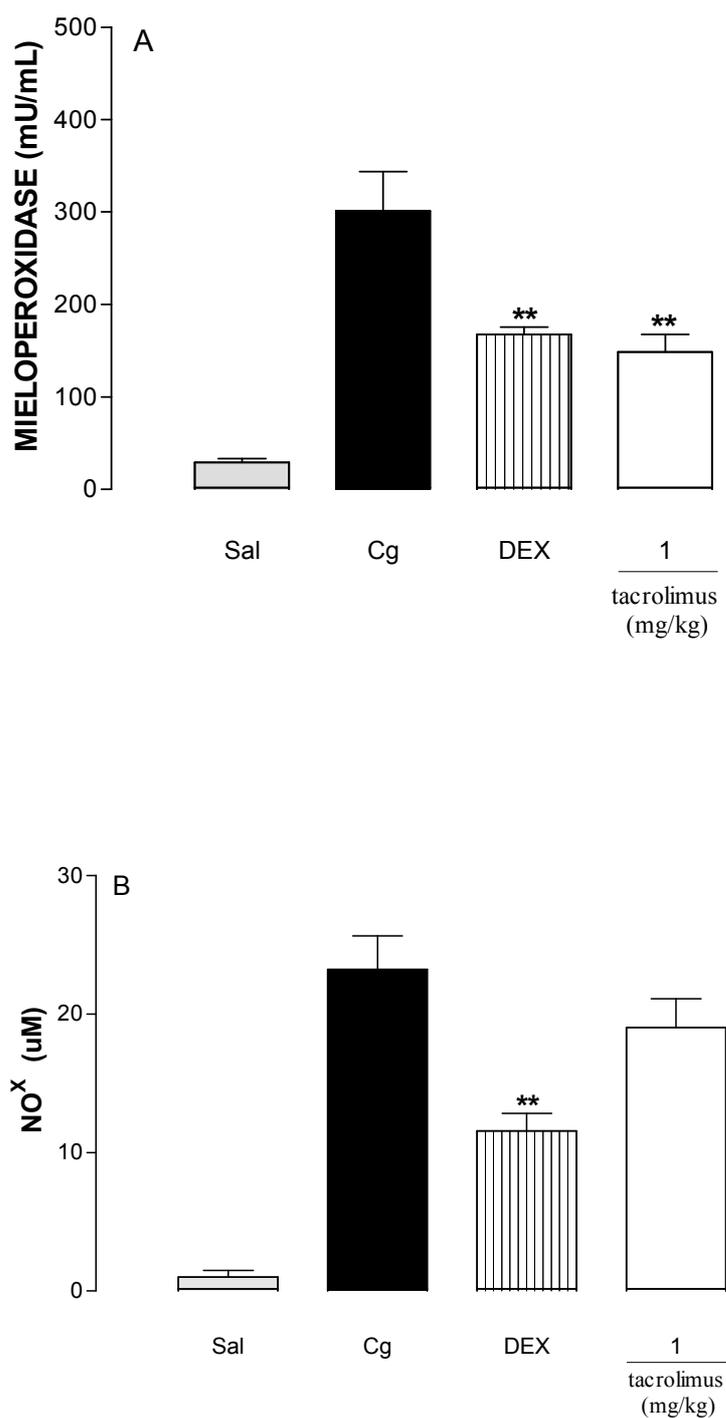


Figura 4 - Efeito do tacrolimus (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre a atividade da mieloperoxidase e os níveis de nitrato/nitrito (NO^x) (B). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.p.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

5.1.4. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina

O TAC (1 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi efetivo em diminuir significativamente os níveis de TNF- α (pg/mL) (Sal: 244,9 \pm 35,3; Cg: 3998,8 \pm 392,76; TAC 1 mg/kg: 2063,8 \pm 177,0) ($P < 0,01$) (Figura 5A) e IL-1 β (pg/mL) (Sal: 0,00 \pm 0,00; Cg: 1215,4 \pm 131,1; TAC 1 mg/kg: 431,0 \pm 25,2) ($P < 0,01$) (Figura 5B) no lavado da cavidade pleural de camundongos quando comparados com animais inflamados. No entanto, o TAC não foi capaz de reduzir os níveis de KC e MIP-2 ($P > 0,05$) (Figuras 5C e D). A DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) também reduziu de forma significativa os níveis de TNF- α (pg/mL) (Sal: Sal: 244,9 \pm 35,3; Cg: 3998,8 \pm 392,76; DEX 0,5 mg/kg: 2689,1 \pm 169,4) ($P < 0,01$) (Figura 5A) e IL-1 β (pg/mL) (Sal: 0,00 \pm 0,00; Cg: 1215,4 \pm 131,1; DEX 0,5 mg/kg: 541,80 \pm 23,9) ($P < 0,01$) (Figura 5B). Da mesma forma, a DEX não foi efetiva em modificar os níveis de KC (pg/mL) ($P > 0,05$) (Figura 5C) e MIP-2 ($P > 0,05$) (Figura 5D) no lavado pleural dos animais com pleurisia. Os percentuais de redução das citocinas estudadas: TNF- α , IL-1 β , KC e MIP-2 estão listados na tabela 3.

TABELA 3 - Valores percentuais de redução dos níveis das citocinas: fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quemocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2 em animais tratados com tacrolimus (1 mg/kg, i.p., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. 0,5 h), modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos

Fármaco (mg/kg, 0,5 h)	TNF- α (% de redução)	IL-1 β (% de redução)	KC (% de redução)	MIP-2 (% de redução)
TAC 1	41,6 \pm 3,9**	47,8 \pm 1,9**	--	--
DEX 0,5	41,4 \pm 2,0**	30,9 \pm 4,2**	--	-

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 2 a 3 animais. ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. TNF- α : fator de necrose tumoral; IL-1 β : interleucina 1 beta; KC: quemocina de neutrófilo; MIP-2: proteína inflamatória de macrófago 2; TAC: tacrolimus; DEX: dexametasona.

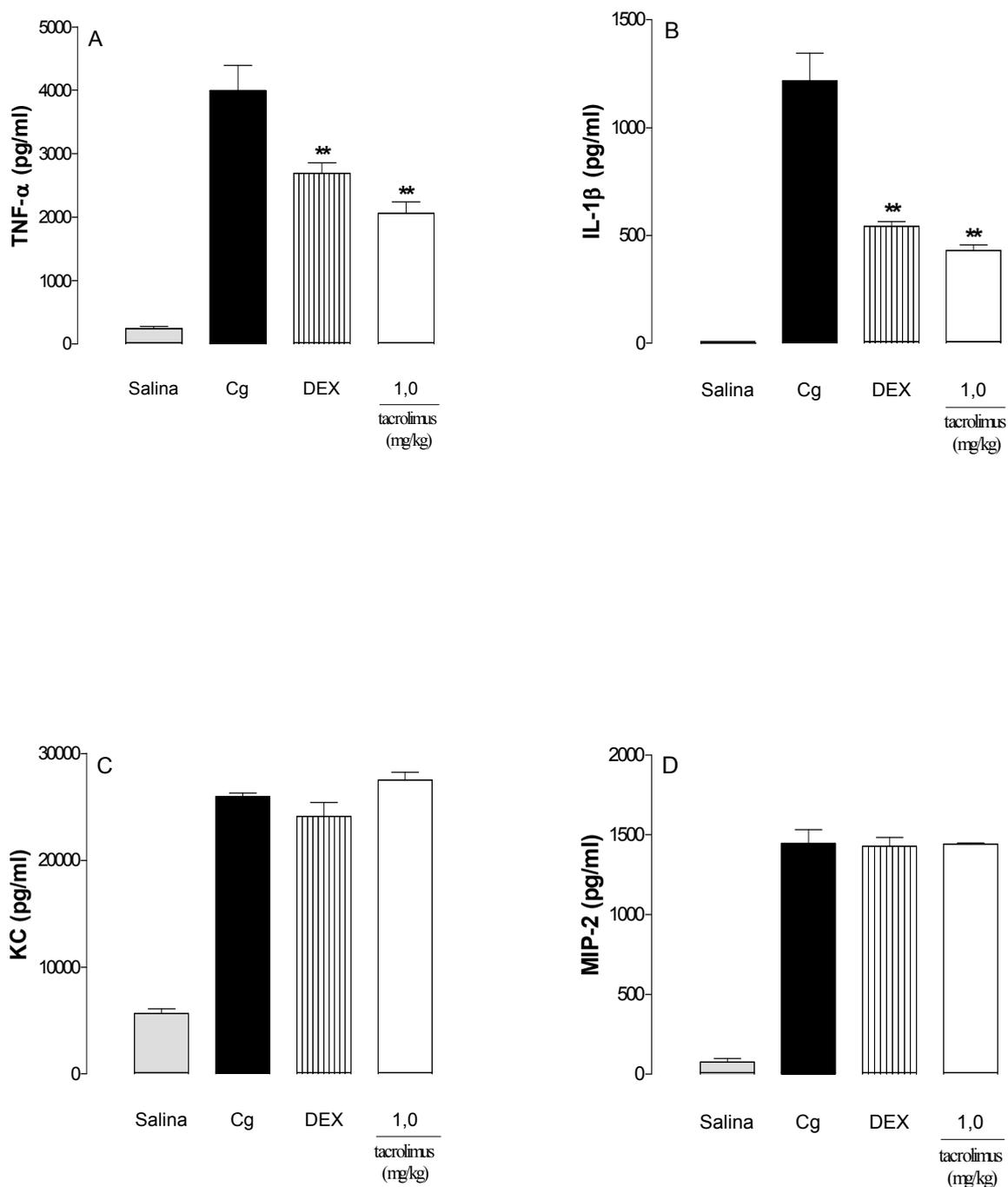


Figura 5 - Efeito do tacrolimus (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B), KC (C) e MIP-2 (B). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 2 a 3 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

5.1.5. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por bradicinina, histamina ou substância P.

Na pleurisia induzida pela BK, a administração do TAC (1 mg/kg) atenuou de forma significativa os leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,95 \pm 0,01$; BK: $2,12 \pm 0,07$; TAC 1 mg/kg: $1,58 \pm 0,18$) ($P < 0,05$) (Figura 6A) às custas de mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,01$; BK: $1,94 \pm 0,10$; TAC 1 mg/kg: $1,39 \pm 0,15$) ($P < 0,05$) (Figura 6C) ($\times 10^6$). Nesta mesma concentração, o TAC não foi efetivo em reduzir os polimorfonucleares ($P > 0,05$) (Figura 6B).

Da mesma forma que o TAC, a DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi efetiva em diminuir a migração leucocitária ($\times 10^6$) (Sal: $0,95 \pm 0,01$; BK: $2,12 \pm 0,07$; DEX 0,5 mg/kg: $1,02 \pm 0,17$) ($P < 0,01$) (Figura 6A), os polimorfonucleares (Sal: $0,03 \pm 0,01$; BK: $0,18 \pm 0,04$; DEX 0,5 mg/kg: $0,05 \pm 0,01$) ($P < 0,05$) (Figura 6B) e os mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,01$; BK: $1,94 \pm 0,10$; DEX 0,5 mg/kg: $0,97 \pm 0,17$) ($P < 0,01$) (Figura 6C).

Na pleurisia induzida pela HIST, o TAC (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da HIST, atenuou significativamente a migração leucocitária ($\times 10^6$) (Sal: $1,15 \pm 0,05$; HIST: $1,95 \pm 0,15$; TAC 1 mg/kg: $1,61 \pm 0,04$) ($P < 0,05$) (Figura 7A). Esta atenuação ocorreu às custas somente da redução de mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,04$; HIST: $1,55 \pm 0,15$; TAC 1 mg/kg: $1,27 \pm 0,02$) ($P < 0,05$) (Figura 7C).

Neste experimento, a DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) diminuiu de forma significativa a migração de leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $1,15 \pm 0,05$; HIST: $1,95 \pm 0,15$; DEX 0,5 mg/kg: $1,26 \pm 0,11$) ($P < 0,01$) (Figura 7A), de polimorfonucleares (Sal: $0,23 \pm 0,01$; HIST: $0,39 \pm 0,01$; DEX 0,5 mg/kg: $0,19 \pm 0,03$) ($P < 0,05$) (Figura 7B) e dos mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,04$; HIST: $1,55 \pm 0,15$; DEX 0,5 mg/kg: $1,07 \pm 0,14$) ($P < 0,05$) (Figura 7C).

No protocolo experimental no qual utilizamos a SP como agente flogístico, o TAC (1 mg/kg, i.p., 0,5 h) reduziu significativamente a migração de leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,95 \pm 0,20$; SP: $2,38 \pm 0,25$; TAC 1 mg/kg: $1,72 \pm 0,10$) ($P < 0,05$) (Figura 8A) e de polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,03 \pm 0,01$; SP: $0,81 \pm 0,06$; TAC 1 mg/kg: $0,51 \pm 0,01$) ($P < 0,01$) (Figura 8B). Porém, nestas mesmas condições, o TAC não foi efetivo em reduzir os mononucleares ($P > 0,05$) (Figura 8C).

A administração de DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) reduziu significativamente apenas os leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,95 \pm 0,20$; SP: $2,38 \pm 0,25$; DEX 0,5 mg/kg: $1,62 \pm 0,08$) ($P < 0,05$) (Figura 8A), e os PMN ($\times 10^6$) (Sal: $0,03 \pm 0,01$; SP: $0,81 \pm 0,06$; DEX 0,5 mg/kg: $0,53 \pm 0,04$) ($P < 0,01$) (Figura 8B),

Os percentuais de redução dos parâmetros pela administração do TAC e da DEX na pleurisia induzida pela BK, HIST ou SP encontram-se listados na tabela 4.

TABELA 4 - Valores percentuais de redução dos parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares em animais tratados com tacrolimus (1 mg/kg, i.p., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), no modelo da pleurisia induzida por bradicinina, histamina ou substância P, em camundongos.

Fármaco (mg/kg, 0,5 h)	Bradicinina (% de redução)	Histamina (% de redução)	Substância P (% de redução)
Leucócitos totais			
TAC (1)	$24,76 \pm 8,73^*$	$16,03 \pm 2,43^*$	$27,52 \pm 4,58^*$
DEX (0,5)	$51,50 \pm 8,13^{**}$	$35,21 \pm 5,79^{**}$	$32,07 \pm 3,53^*$
Polimorfonucleares			
TAC (1)	--	--	$36,42 \pm 1,29^{**}$
DEX (0,5)	$72,22 \pm 6,41^*$	$52,50 \pm 8,66^*$	$34,57 \pm 4,98^{**}$
Mononucleares			
TAC (1)	$28,61 \pm 7,83^*$	$15,81 \pm 3,74^*$	--
DEX (0,5)	$49,83 \pm 8,50^{**}$	$30,75 \pm 8,97^*$	--

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 4 a 6 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com um dos agentes flogísticos e os demais grupos. TAC: tacrolimus; DEX: dexametasona.

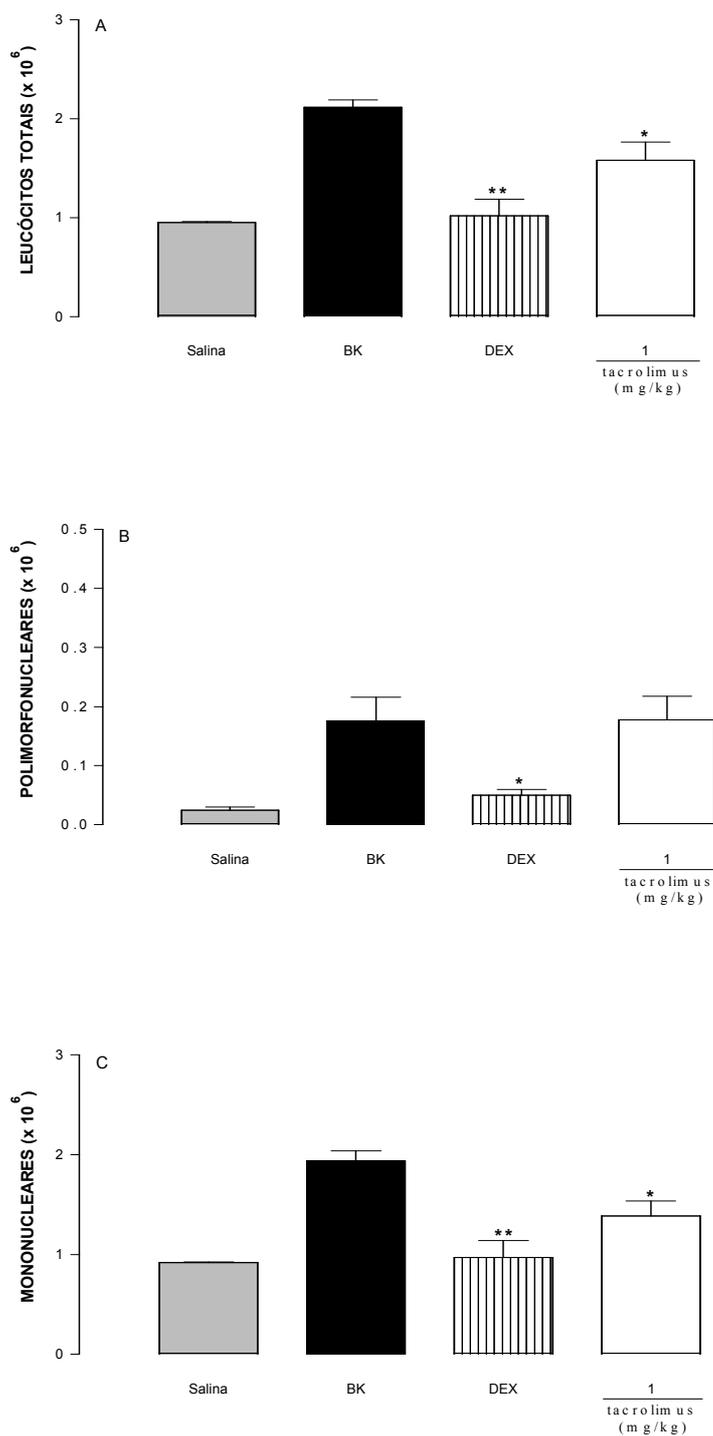


Figura 6 - Efeito do tacrolimus (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da bradicinina (BK 10 nmol/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). BK = animais tratados apenas com bradicinina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e bradicinina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a bradicinina e os demais grupos.

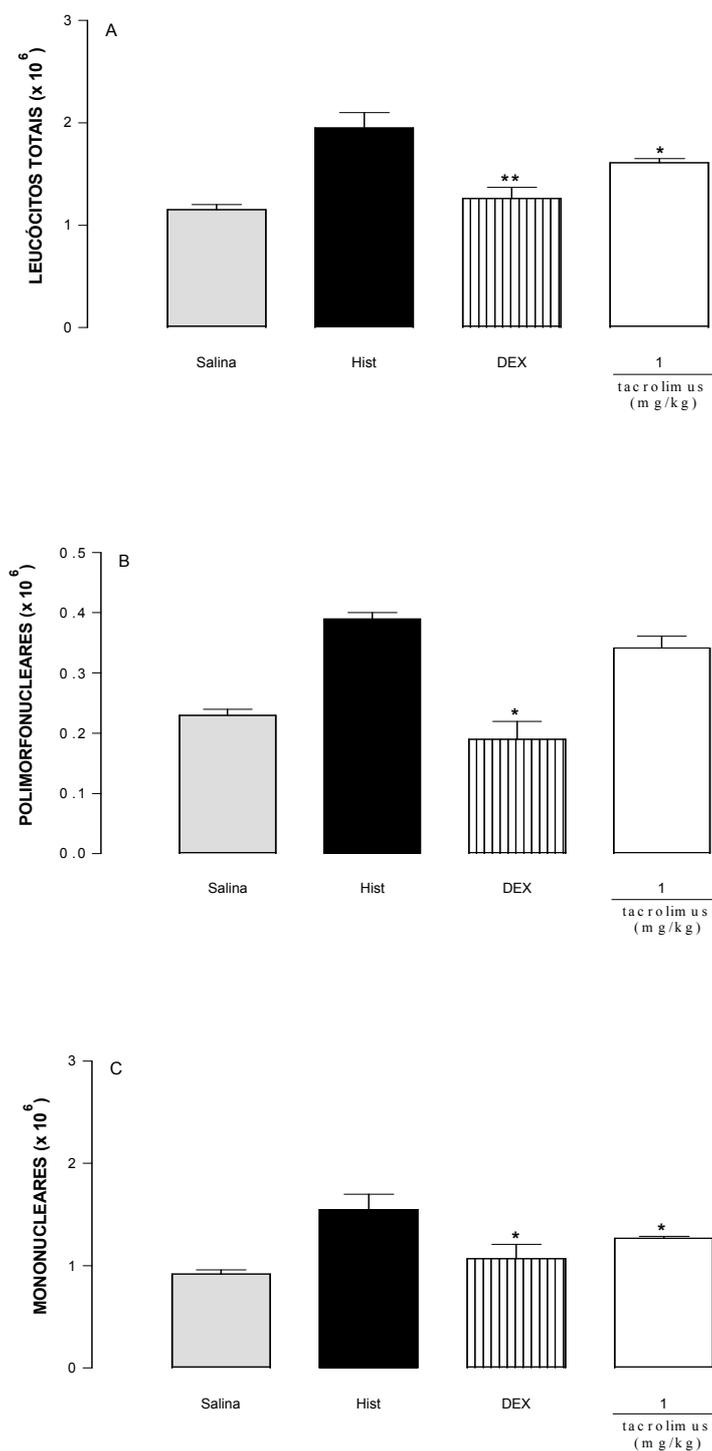


Figura 7 - Efeito do tacrolimus (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da histamina (HIST 100 μ g/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.p.). HIST = animais tratados apenas com histamina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e histamina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a histamina e os demais grupos.

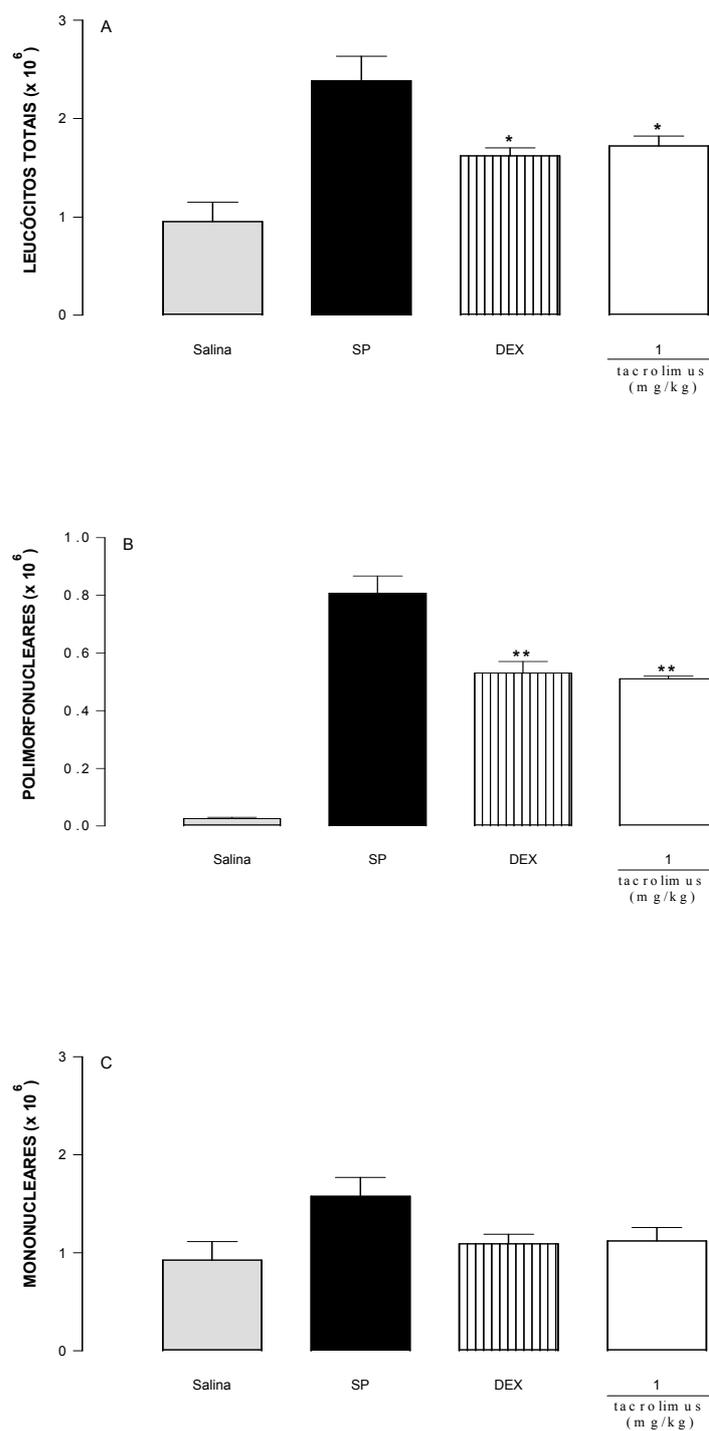


Figura 8 - Efeito do tacrolimus (1 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da substância P (SP 20 nmol/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). SP = animais tratados apenas com substância P. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e substância P. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a substância P e os demais grupos.

5.2. Tacrolimus Administrado por via oral

5.2.1. Efeito do tacrolimus sobre a migração de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

Neste protocolo experimental, o TAC administrado nas doses de 3 a 10 mg/kg (i.p.) 0,5 h antes da pleurisia induzida pela Cg 4 h foi efetivo em reduzir significativamente e de forma dose-dependente a migração de leucócitos para a cavidade pleural dos animais inflamados quando comparados ao grupo-controle (Sal: $1,08 \pm 0,09$; Cg: $5,42 \pm 0,23$; TAC 3 mg/kg: $3,60 \pm 0,23$; TAC 5 mg/kg: $2,89 \pm 0,27$; TAC 10 mg/kg: $3,69 \pm 0,08$) ($P < 0,01$) (Figura 9A). Essa diminuição de leucócitos foi devido à redução da migração de polimorfonucleares (Sal: $0,09 \pm 0,02$; Cg: $4,75 \pm 0,23$; TAC 3 mg/kg: $3,04 \pm 0,22$; TAC 5 mg/kg: $2,23 \pm 0,25$; TAC 10 mg/kg: $1,73 \pm 0,20$) ($P < 0,01$) (Figura 9B). No entanto, o TAC não foi capaz de alterar os níveis de mononucleares ($P > 0,05$) (Figuras 9C).

Na análise do perfil temporal, o TAC reduziu de forma significativa a migração de leucócitos quando administrado até 48 h antes da indução da inflamação (Sal: $0,98 \pm 0,09$; Cg: $5,39 \pm 0,24$; TAC 2 h: $3,04 \pm 0,44$; TAC 4 h: $3,61 \pm 0,85$; TAC 24 h: $4,10 \pm 0,31$; TAC 48 h: $3,82 \pm 0,55$) ($P < 0,01$) (Figura 10A). Essa redução ocorreu às custas de polimorfonucleares (Sal: $0,09 \pm 0,02$; Cg: $4,72 \pm 0,25$; TAC 2 h: $2,12 \pm 0,19$; TAC 4 h: $2,91 \pm 0,76$; TAC 24 h: $3,22 \pm 0,33$; TAC 48 h: $2,95 \pm 0,44$) ($P < 0,01$) (Figura 10B). Não foi observado redução significativa da migração de mononucleares ($P > 0,05$) (Figura 10C).

A DEX reduziu a migração de leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,98 \pm 0,09$; Cg: $5,39 \pm 0,24$; DEX 0,5 mg/kg: $1,98 \pm 0,56$) ($P < 0,01$) (Figuras 9A e 10A), sendo que esta redução ocorreu às custas de PMN ($\times 10^6$) (Sal: $0,09 \pm 0,02$; Cg: $4,72 \pm 0,25$; DEX 0,5 mg/kg: $1,41 \pm 0,19$) ($P < 0,01$) (Figuras 9B e 10B). Os percentuais de redução dos parâmetros estudados: leucócitos, PMN e MN estão listados na tabela 5 e 6.

TABELA 5 - Valores percentuais de redução dos parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares em animais tratados com tacrolimus (1 a 10 mg/kg, v.o., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. 0,5 h), no modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

Fármaco (mg/kg, 0,5 h)	Leucócitos totais (% de redução)	PMN (% de redução)	MN (% de redução)
TAC 1	--	--	--
TAC 3	33,58±4,70**	36,00±4,68**	--
TAC 5	46,68±4,90**	53,05±5,24**	--
TAC 10	50,41±1,52**	63,58±4,37**	--
DEX 0,5	66,74±4,38**	73,12±2,39**	--

Cada grupo representa a média das percentagens ± e.p.m. de 4 a 6 animais. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. PMN: polimorfonucleares; MN: mononucleares; TAC: tacrolimus; DEX: Dexametasona.

TABELA 6 - Valores percentuais de redução dos parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares em animais tratados com tacrolimus (10 mg/kg, v.o. 0,5 a 72 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) antes da indução da pleurisia por carragenina, em camundongos.

Fármaco mg/kg /h	Leucócitos totais (% de redução)	PMN (% de redução)	MN (% de redução)
TAC 10, 02 h	32,90±8,10**	33,85±8,40**	--
TAC 10, 04 h	27,76±8,92**	32,35±10,10**	--
TAC 10, 24 h	44,08±12,18**	46,56±12,95**	--
TAC 10, 48 h	29,19±10,29**	37,30±9,29**	--
TAC 10, 72 h	--	--	--
DEX 0,5	66,74±4,39**	73,12±2,39**	--

Cada grupo representa a média das percentagens ± e.p.m. de 4 a 6 animais. ** P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. PMN: polimorfonucleares; MN: mononucleares; TAC: tacrolimus; DEX: dexametasona.

5.2.2. Efeito do tacrolimus sobre os níveis de leucócitos no sangue de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

A avaliação do hemograma revelou que os camundongos tratados previamente com TAC (1 a 10 mg/kg, v.o.) não apresentaram modificação nos níveis de leucócitos no sangue (P > 0,05) (Figura 11).

A DEX inibiu os leucócitos sanguíneos ($\times 10^6$) (Sal: $4,1 \pm 0,40$; Cg: $4,1 \pm 0,29$; DEX 0,5 mg/kg: $2,1 \pm 0,37$) ($P < 0,01$), e esta redução ocorreu às custas de mononucleares (Sal: $3,6 \pm 0,37$; Cg: $3,5 \pm 0,30$; DEX 0,5 mg/kg: $1,6 \pm 0,29$) ($P < 0,01$) (Figuras 11A e 11C).

5.2.3 Efeito do tacrolimus sobre a atividade da mieloperoxidase e os níveis de nitrato/nitrito na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

O TAC (10 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da Cg atenuou somente a atividade da MPO (mU/mL) (Sal: $31,8 \pm 4,15$; Cg: $296,3 \pm 33,27$; TAC 10 mg/kg: $170,3 \pm 9,72$) ($P < 0,01$) (Figura 12A).

A DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) reduziu de forma significativa a atividade da MPO (mU/mL) (Sal: $31,8 \pm 4,15$; Cg: $296,3 \pm 33,27$; DEX 0,5 mg/kg: $152,1 \pm 16,5$) ($P < 0,01$) (Figura 4A) e os níveis de NO^x (μM) (Sal $0,98 \pm 0,49$; Cg: $22,64 \pm 2,71$; DEX 0,5 mg/kg: $11,23 \pm 0,94$) ($P < 0,01$) (Figura 4C). Os percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: MPO e NO^x estão listados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores percentuais de redução da atividade da mieloperoxidase e dos níveis de óxido nítrico em animais tratados com tacrolimus (10 mg/kg, v.o., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. 0,5 h), no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

Fármaco (mg/kg, 0,5 h)	Mieloperoxidase (% de redução)	Nitrato/nitrito (% de redução)
TAC 10 mg/kg	$42,54 \pm 3,28^{**}$	--
DEX 0,5	$48,67 \pm 5,56^{**}$	$51,55 \pm 4,07^{**}$

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 4 a 6 animais. $^{**} P < 0,01$ representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. TAC: tacrolimus; DEX: dexametasona.

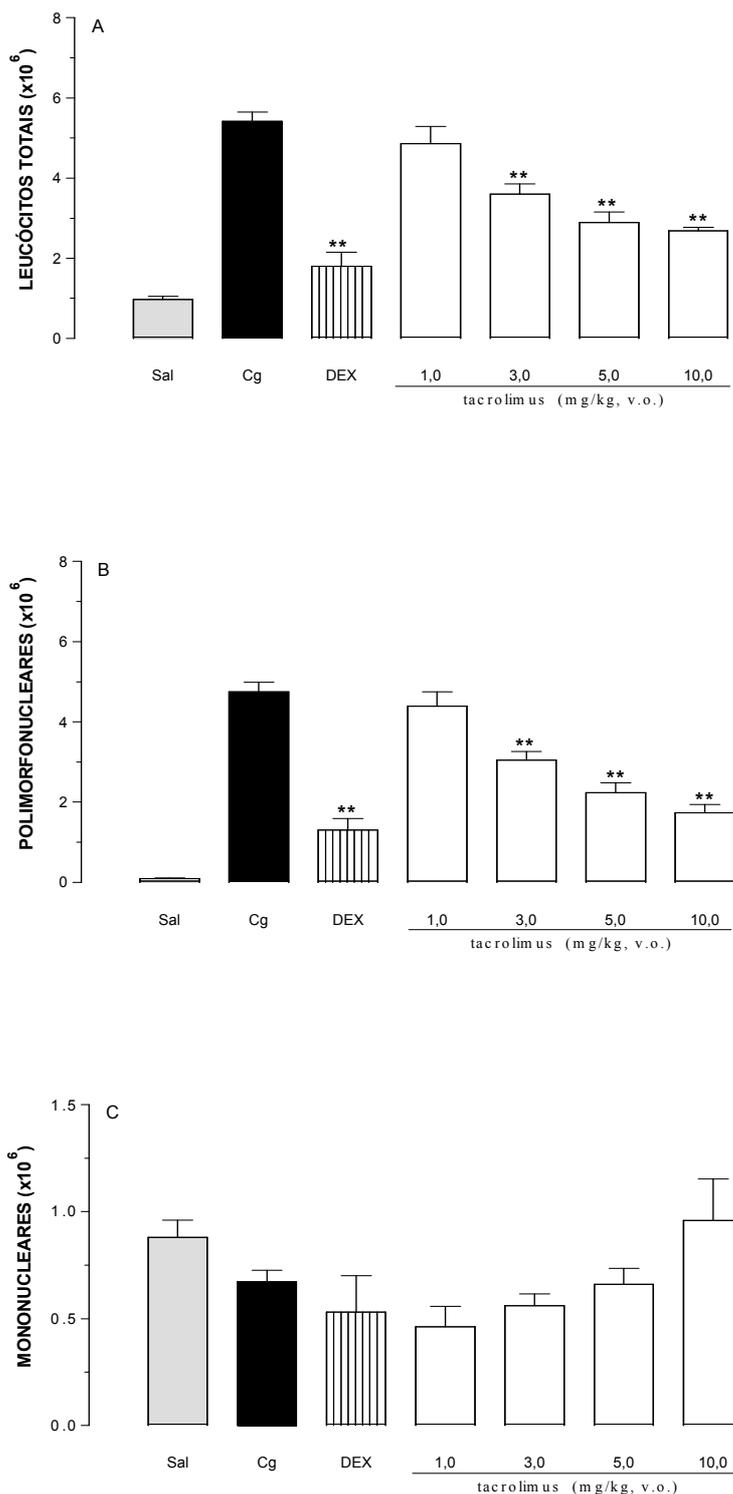


Figura 9 - Efeito de diferentes doses de tacrolimus (1 a 10 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. **P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

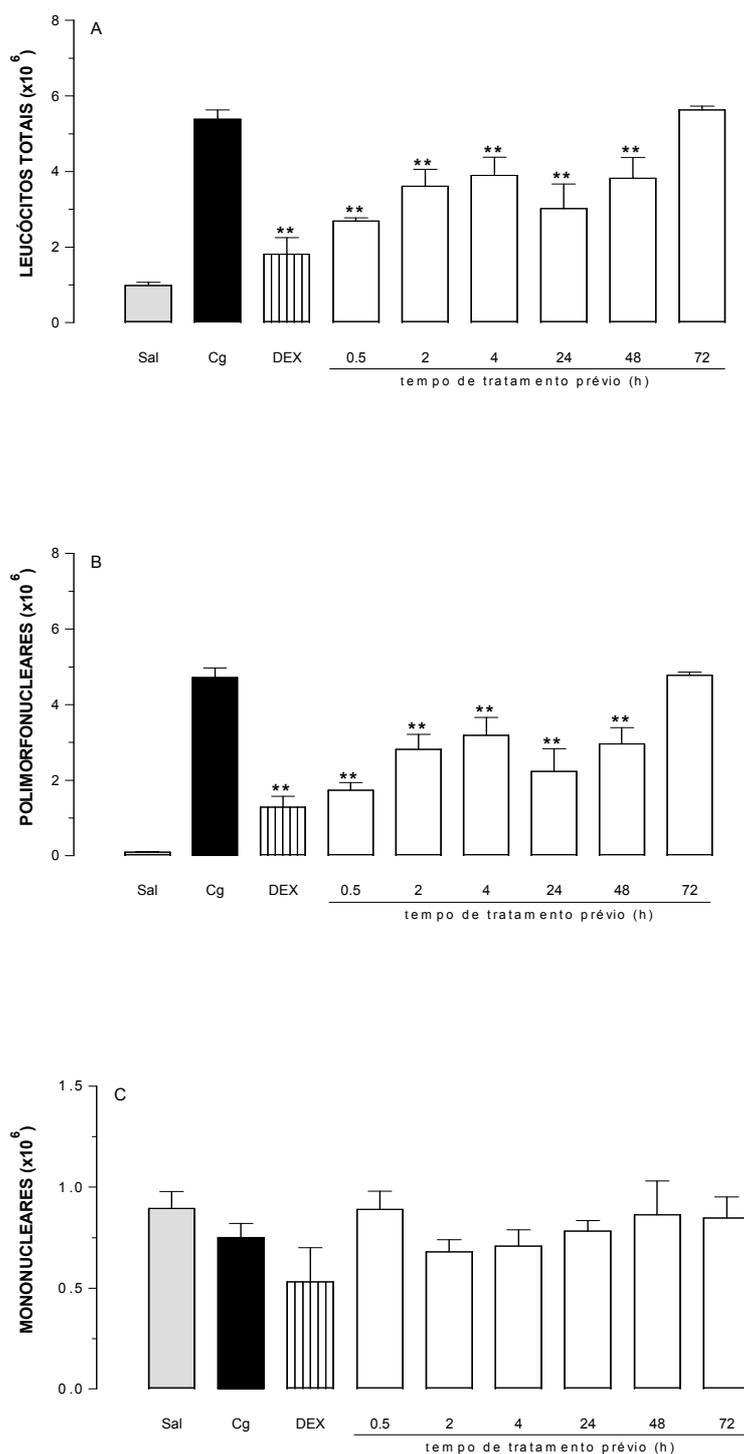


Figura 10 - Efeito do tacrolimus (10 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 a 72 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 3 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

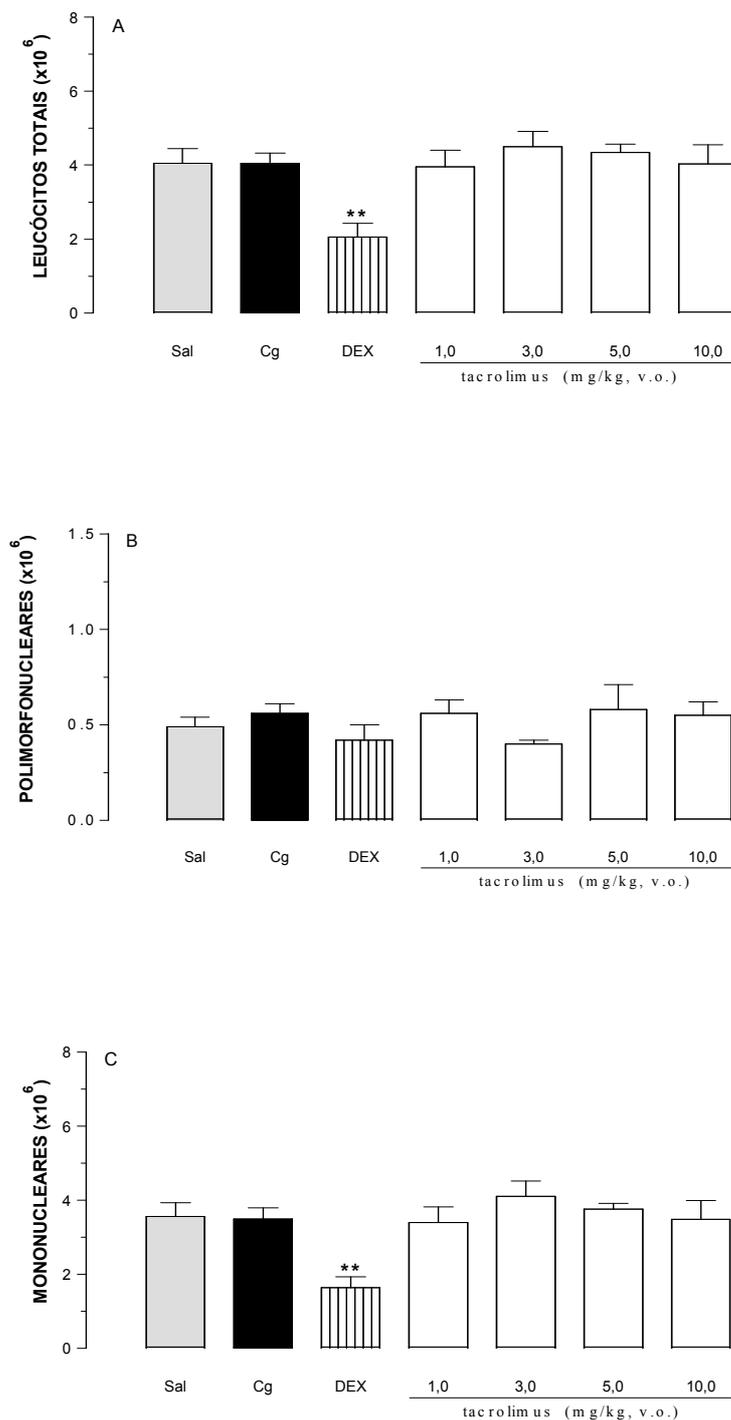


Figura 11 - Efeito de diferentes doses de tacrolimus (1 a 10 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) sanguíneos. Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

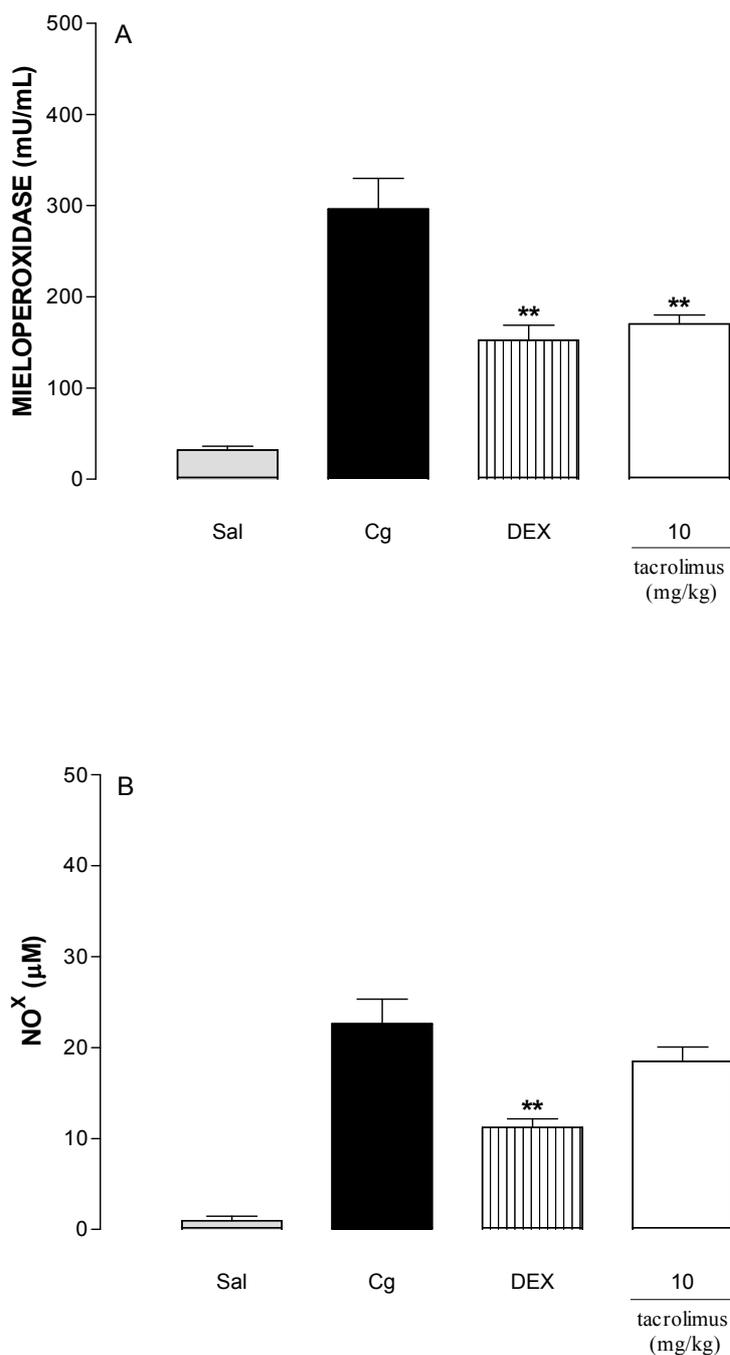


Figura 12 - Efeito do tacrolimus (10 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre a atividade da mieloperoxidase (A) e os níveis de nitrato/nitrito (NO^x) (B). Sal = animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9% i.p.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

5.2.4 Efeito do tacrolimus sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.

O TAC (10 mg/kg, v.o., 0,5 h) reduziu de forma significativa os níveis de TNF- α (pg/mL) (Sal: 237,6 \pm 21,6; Cg: 3946,6 \pm 388,9; TAC 10 mg/kg: 2110,2 \pm 179,8) ($P < 0,01$) (Figura 13A) e IL-1 β (pg/mL) (Sal: 2,60 \pm 2,60; Cg: 1225, \pm 102,0; TAC 10 mg/kg: 438,5 \pm 48,6) ($P < 0,01$) (Figura 13B) no exudato da cavidade pleural quando comparados com animais inflamados. Porém, o TAC não foi capaz de reduzir os níveis de KC e MIP-2 ($P > 0,05$) (Figuras 13C e 13D).

A DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) reduziu significativamente os níveis de TNF- α (pg/mL) (Sal: 237,6 \pm 21,6; Cg: 3946,6 \pm 388,9; DEX 0,5 mg/kg: 2518,8 \pm 245,9) ($P < 0,01$) (Figura 13A) e IL-1 β (pg/mL) (Sal: 0,00 \pm 0,00; Cg: 1215,4 \pm 131,1; DEX 0,5 mg/kg: 512,5 \pm 26,0) ($P < 0,01$) (Figura 13B), e não os níveis de KC (pg/mL) e MIP-2 ($P > 0,05$) (Figuras 13C e 13D). As percentagens de redução das citocinas estudadas: TNF- α , IL-1 β , KC e MIP-2 estão listados na tabela 8.

TABELA 8 - Valores percentuais de redução dos níveis de citocinas: fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quemocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2 em animais tratados com tacrolimus (10 mg/kg, v.o., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. 0,5 h), modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

Fármaco (mg/kg 0,5 h)	TNF- α (% de redução)	IL-1 β (% de redução)	KC (% de redução)	MIP-2 (% de redução)
TAC 10	46,53 \pm 4,56**	64,22 \pm 3,97**	--	--
DEX 0,5	35,46 \pm 4,89**	58,16 \pm 2,12**	--	--

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 2 a 3 animais. ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. TNF- α : fator de necrose tumoral; IL-1 β : interleucina 1 beta; KC: quemocina de neutrófilo; MIP-2: proteína inflamatória de macrófago 2; TAC: Tacrolimus; DEX: dexametasona.

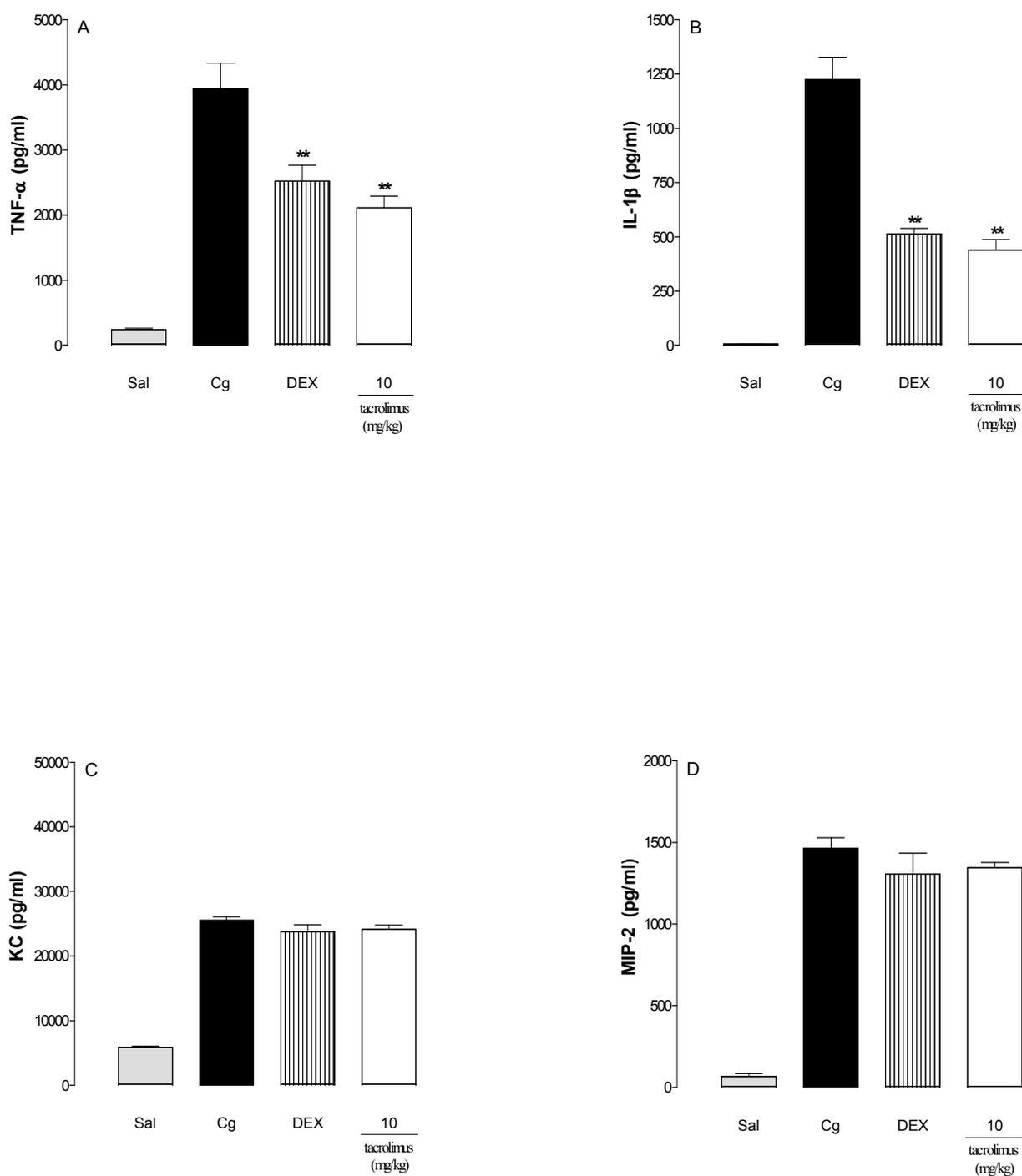


Figura 13 - Efeito do tacrolimus (10 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de citocinas TNF- α (A), IL-1 β (B), KC (C) e MIP-2 (D). Sal = animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). Cg = animais tratados apenas com carragenina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 2 a 3 animais e a barra vertical o e.p.m. ** P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

5.2.5 Efeito do tacrolimus sobre os níveis de leucócitos na cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida por bradicinina, histamina ou substância P.

Na pleurisia induzida pela BK, o TAC (10 mg/kg) reduziu significativamente a migração de leucócitos ($\times 10^6$) para a cavidade pleural (Sal: $0,96 \pm 0,04$; BK: $2,11 \pm 0,02$; TAC 10 mg/kg: $1,54 \pm 0,09$) ($P < 0,05$) (Figura 14A) às custas de mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,93 \pm 0,01$; BK: $1,95 \pm 0,05$; TAC 10 mg/kg: $1,38 \pm 0,09$) ($P < 0,05$) (Figura 14C). Porém, O TAC não foi efetivo em reduzir os polimorfonucleares ($P > 0,05$) (Figura 14B).

Neste mesmo protocolo experimental, a administração de DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi efetiva em diminuir significativamente os leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,96 \pm 0,04$; BK: $2,11 \pm 0,02$; DEX 0,5 mg/kg: $1,03 \pm 0,17$) ($P < 0,01$) (Figura 14A), os mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,93 \pm 0,01$; BK: $1,95 \pm 0,05$; DEX 0,5 mg/kg: $0,99 \pm 0,16$) ($P < 0,01$) (Figura 14C), mas não os polimorfonucleares ($P > 0,05$) (Figura 14B).

Na pleurisia induzida pela HIST, o TAC (10 mg/kg) administrado 0,5 h antes da HIST, reduziu significativamente a migração leucocitária ($\times 10^6$) (Sal: $1,15 \pm 0,03$; HIST: $2,03 \pm 0,05$; TAC 10 mg/kg: $1,64 \pm 0,05$) ($P < 0,05$) (Figura 15A). Esta redução ocorreu às custas somente de mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,02$; HIST: $1,65 \pm 0,06$; TAC 10 mg/kg: $1,31 \pm 0,06$) ($P < 0,05$) (Figura 15C).

A DEX 0,5 mg/kg, i.p. administrada 0,5 h antes da histamina diminuiu de forma significativa a migração de leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $1,15 \pm 0,05$; HIST: $2,03 \pm 0,05$; DEX 0,5 mg/kg: $1,31 \pm 0,14$) ($P < 0,01$) (Figura 15A) e de mononucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,04$; HIST: $1,65 \pm 0,06$; DEX 0,5 mg/kg: $1,02 \pm 0,07$) ($P < 0,01$) (Figura 15C), mas não de polimorfonucleares ($P > 0,05$) (Figura 15B).

Na pleurisia induzida pela SP, o TAC (10 mg/kg, v.o., 0,5 h) reduziu significativamente a migração de leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,19$; SP: $2,39 \pm 0,26$; TAC 10 mg/kg: $1,65 \pm 0,18$) ($P < 0,05$) (Figura 16A) e somente os polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,05 \pm 0,01$; SP: $0,85 \pm 0,05$; TAC 10 mg/kg: $0,52 \pm 0,01$) ($P < 0,01$) (Figura 16B).

A administração de DEX (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) reduziu somente os leucócitos ($\times 10^6$) (Sal: $0,92 \pm 0,19$; SP: $2,39 \pm 0,26$; DEX 0,5 mg/kg: $1,53 \pm 0,08$) ($P < 0,05$) (Figura 16A) e os polimorfonucleares ($\times 10^6$) (Sal: $0,05 \pm 0,01$; SP: $0,85 \pm 0,05$; DEX 0,5 mg/kg: $0,51 \pm 0,07$) ($P < 0,01$) (Figura 16B).

Os percentuais de redução dos leucócitos na pleurisia induzida pela BK, HIST ou SP encontram-se listados na tabela 9.

TABELA 9 - Valores percentuais de redução dos parâmetros inflamatórios: leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares em animais tratados com tacrolimus (10 mg/kg v.o., 0,5 h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. 0,5 h), modelo da pleurisia induzida por bradicinina, histamina ou substância P, em camundongos..

Fármaco (mg/kg 0,5 h)	Bradicinina (% de redução)	Histamina (% de redução)	Substância P (% de redução)
Leucócitos totais			
TAC (10)	$27,13 \pm 4,15^*$	$19,34 \pm 2,33^*$	$30,96 \pm 7,69^*$
DEX (0,5)	$51,19 \pm 7,89^{**}$	$35,64 \pm 7,12^{**}$	$36,12 \pm 3,54^*$
Polimorfonucleares			
TAC (10)	--	--	$38,53 \pm 6,61^{**}$
DEX (0,5)	$77,08 \pm 8,33^*$	$54,39 \pm 7,65^*$	$39,61 \pm 8,10^{**}$
Mononucleares			
TAC (10)	$29,62 \pm 4,71^*$	$20,91 \pm 3,52^*$	--
DEX (0,5)	$49,06 \pm 8,40^{**}$	$37,98 \pm 4,28^{**}$	--

Cada grupo representa a média das percentagens \pm e.p.m. de 4 a 6 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com um dos agentes flogísticos e os demais grupos. TAC: tacrolimus; DEX: dexametasona.

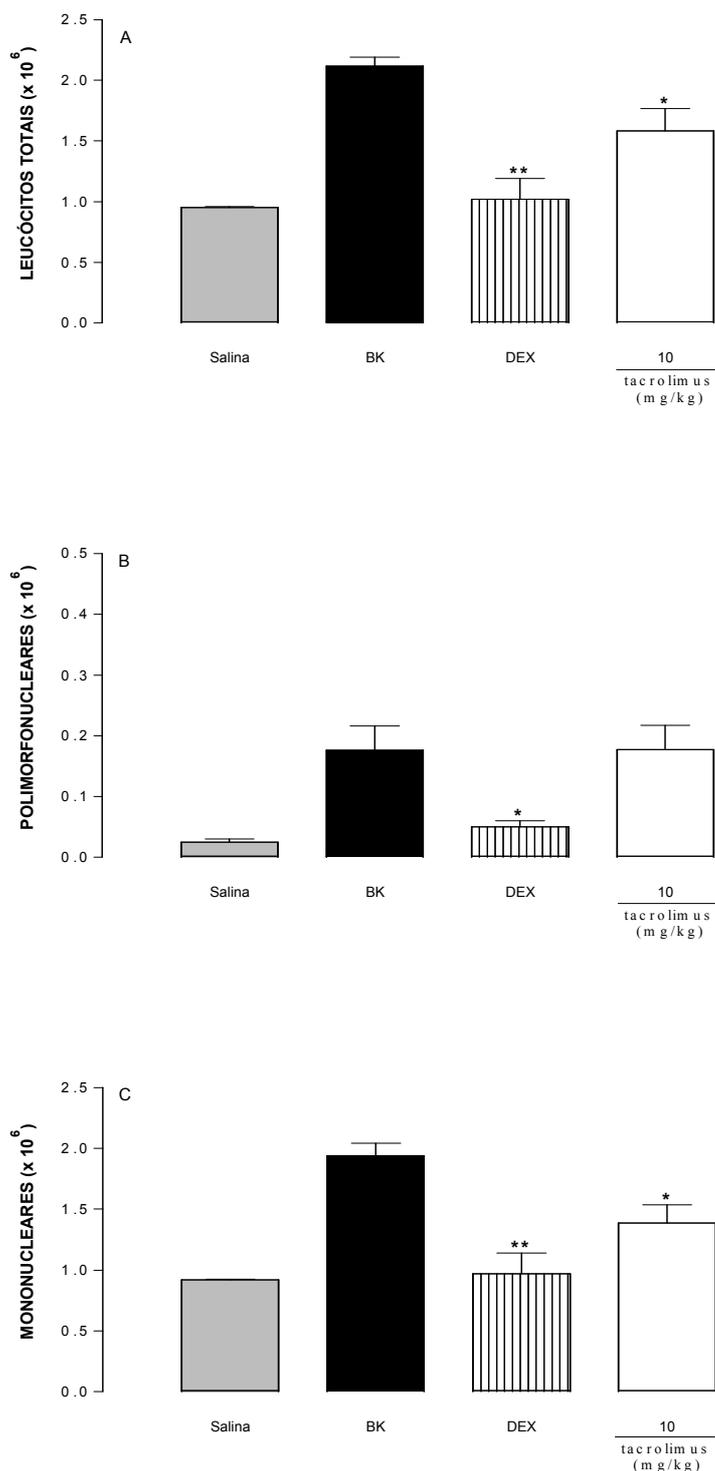


Figura 14 - Efeito do tacrolimus (10 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da bradicinina (BK 10 nmol/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). BK = animais tratados apenas com bradicinina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e bradicinina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a bradicinina e os demais grupos.

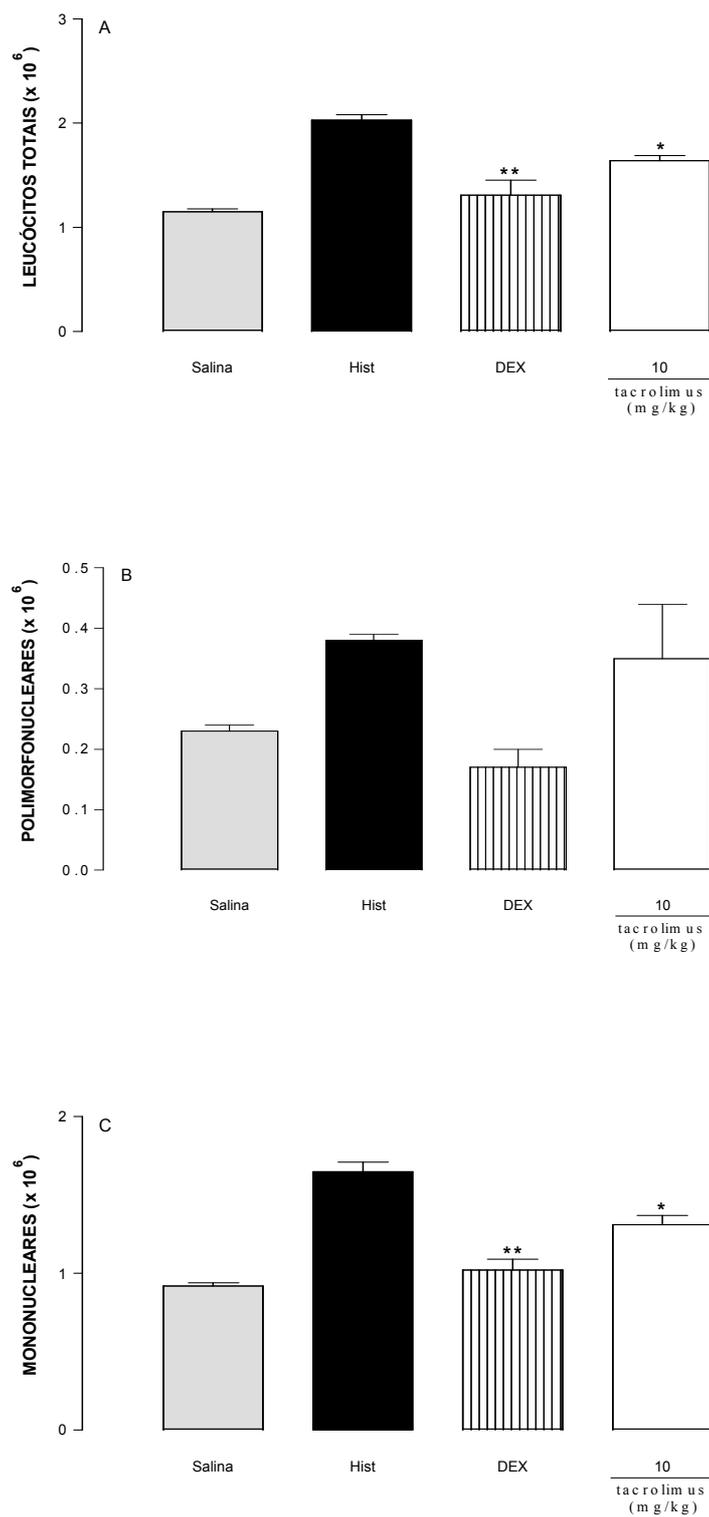


Figura 15 - Efeito do tacrolimus (10 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da histamina (HIST 100 μ g/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). HIST = animais tratados apenas com histamina. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e histamina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a histamina e os demais grupos.

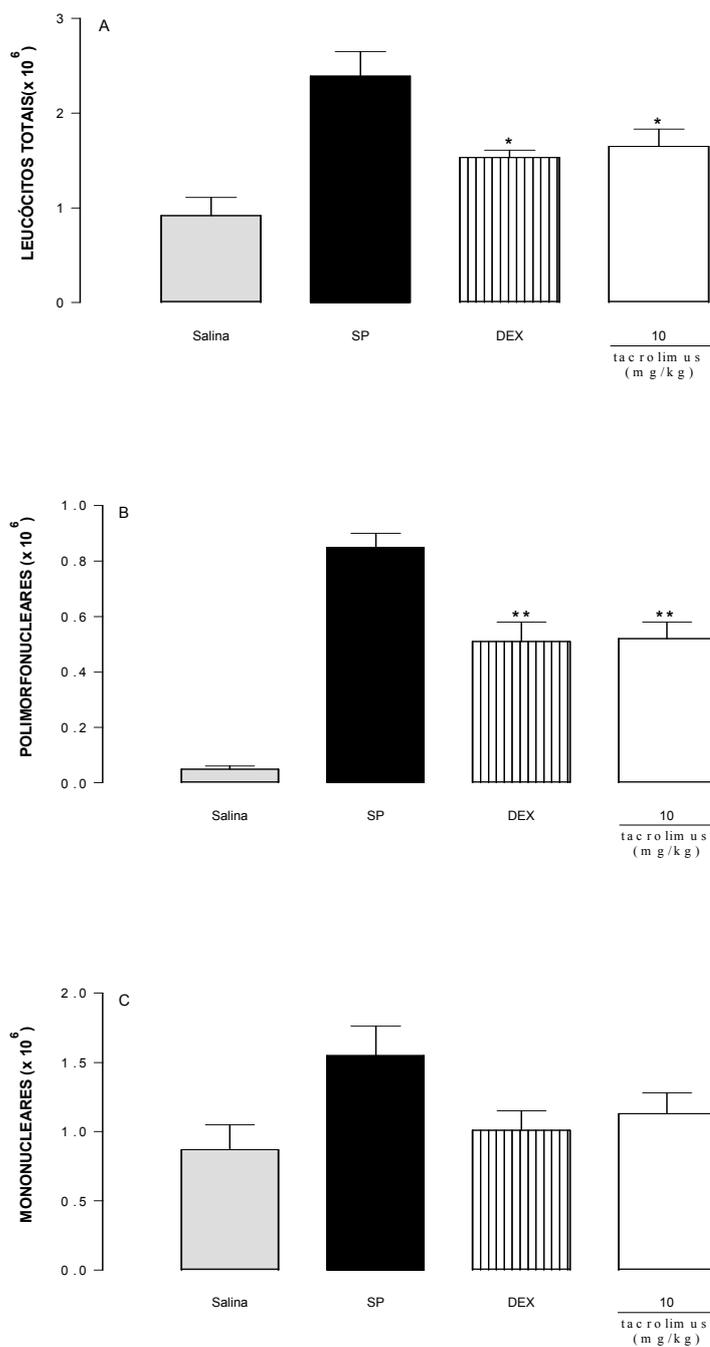


Figura 16 - Efeito do tacrolimus (10 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da substância P (SP 20 nmol/cav.) em camundongos com pleurisia, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C). Sal = animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9% i.pl.). SP = animais tratados apenas com substância P. DEX = animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e substância P. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a substância P e os demais grupos.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para melhor elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório do imunossupressor tacrolimus. Este é o primeiro trabalho a utilizar o modelo de pleurisia induzida em camundongos para avaliar as propriedades antiinflamatórias deste fármaco.

Para a avaliação do efeito deste fármaco sobre a migração celular utilizou-se o modelo da pleurisia induzida por carragenina e por outros agentes flogísticos (BK, SP e HIST), em camundongos. Neste modelo experimental observa-se uma significativa resposta inflamatória 4 h após a indução da pleurisia por carragenina. Nesta fase ocorre um aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, aumento da atividade de enzimas relacionadas ao processo de inflamação como a mieloperoxidase, além do aumento dos níveis de metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato) na cavidade pleural^{13,14,132,134,137,145}.

Na análise dos resultados obtidos com o tacrolimus, o efeito antiinflamatório do fármaco administrado por via intraperitoneal foi sobre a migração de leucócitos para a cavidade pleural, sendo que este efeito observado foi duradouro. A redução da migração de leucócitos ocorreu às custas da diminuição de polimorfonucleares, principais células a migrarem para a cavidade pleural na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória neste modelo experimental¹³². Resultados semelhantes foram obtidos quando o tacrolimus foi administrado por via oral. Neste caso, a redução da migração de leucócitos para a cavidade pleural foi também duradoura e de forma dose-dependente. Outro fator importante a mencionar é que os efeitos do tacrolimus na redução da migração dos leucócitos na inflamação pela carragenina foram semelhantes àqueles obtidos com animais inflamados e tratados previamente com a dexametasona.

A migração de leucócitos para o local de inflamação é um dos processos chave da resposta inflamatória. Este processo envolve a mobilização de polimorfonucleares da circulação e de reservas da medula óssea em resposta a estímulos quimiotáticos derivados do hospedeiro ou do patógeno¹⁴⁶. Além disso, uma complexa seqüência de eventos está associada

à adesão e a migração de leucócitos dos vasos para o local inflamado¹⁴⁷. Essas etapas são mediadas por moléculas de adesão do tipo selectinas (P-selectina, L-selectina, E-selectina), integrinas (LFA-1, Mac-1 e VLA-4) e da superfamília de imunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1)^{43,148,149}. A expressão dessas proteínas pode ser induzida por uma série de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ ¹⁵⁰. Uma vez que o efeito antiinflamatório do tacrolimus observado no nosso estudo foi principalmente sobre o influxo de leucócitos, vale a pena comentar relatos obtidos sobre o efeito de imunossupressores na inibição do influxo de leucócitos.

Estudos têm demonstrado o efeito de imunossupressores sobre a migração leucocitária em diversos modelos experimentais, como por exemplo, na artrite induzida por colágeno, no transplante cardíaco, em ratos e na pneumonia induzida por *Escherichia coli*, em camundongos^{151,152,153}. Nós podemos ainda mencionar outros experimentos realizados em ratos nos quais os autores demonstraram que o tacrolimus reduziu a adesão de leucócitos. ASAKO et al (1992), utilizando a técnica de microscopia intravital, demonstraram que o tacrolimus reduziu a adesão dos leucócitos nas células endoteliais em veias pós-capilares expostas ao fator ativador de plaquetas (PAF) ou Leucotrieno B4 (LTB4)¹⁵⁴. Outros experimentos também revelaram que o tacrolimus diminuiu o influxo de neutrófilos, como por exemplo, no modelo de hemorragia cerebral, em ratos, demonstrando desta forma uma propriedade neuroprotetora¹⁵⁵.

Em humanos já existem também estudos avaliando o efeito de imunossupressores na migração leucocitária em diversas doenças. Por exemplo, já foi demonstrado que o imunossupressor metrotexato reduziu a migração leucocitária no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide^{156,157}. Outro estudo demonstrou que a ciclosporina A também diminuiu a migração de neutrófilos para a conjuntiva, em pacientes com ceratoconjuntivite¹⁵⁸.

Em nosso estudo não avaliamos o efeito do tacrolimus na expressão ou não de moléculas de adesão. No entanto, uma vez que um dos principais mecanismos de inibição do influxo de leucócitos é por meio da inibição de moléculas de adesão, vale a pena informar sobre os estudos da ação de imunossupressores sobre estas proteínas.

Os efeitos de fármacos imunossupressores sobre a inibição de moléculas de adesão já são conhecidos. Como exemplo podemos citar um estudo realizado por Tsuzuki et al (1998). Neste estudo, experimentos realizados *in vitro* demonstraram que o tacrolimus reduziu a

adesão de células humanas NALM-6 (linhagem celular de células pré-B humanas) em células endoteliais de linfonodos de camundongos (linhagem KOP2.16: células endoteliais derivadas de linfonodos periféricos de camundongos). Este efeito inibitório foi devido a inibição das moléculas de adesão VLA-4 e VCAM-1, as quais estão envolvidas na adesão e na transmigração celular. Além disso, neste mesmo estudo foi demonstrado que o tacrolimus também reduziu as moléculas de adesão VLA-4 e VCAM-1 em experimentos *in vivo*.¹⁵⁹. O tacrolimus também diminuiu a expressão das moléculas de adesão do tipo P-selectina e ICAM-1, no modelo de isquemia e reperfusão, em ratos, promovendo dessa forma uma redução na adesão e no rolamento destes leucócitos¹⁶⁰. Outro estudo realizado por SASAKAWA et al (2005) demonstrou que o tacrolimus diminuiu a expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, em cultura de células vasculares endoteliais humanas (HMVEC) por meio da inibição da secreção de TNF- α de células mononucleares do sangue periférico humano¹⁶¹.

Em nosso estudo, uma vez que o tacrolimus reduziu a migração de leucócitos induzida por diferentes agentes flogísticos, podemos sugerir que este fármaco diminuiu o influxo de leucócitos via atenuação da produção e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias que estão relacionadas à quimiotaxia de leucócitos como bradicinina, a histamina, a substância P e o óxido nítrico e as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Além disso, ao compararmos o efeito do tacrolimus com os animais tratados previamente com a dexametasona, observamos efeitos similares. Isto demonstra que possivelmente os dois fármacos possuem vias comuns de ação antiinflamatória. Mecanismos não genômicos podem estar envolvidos também nestes efeitos antiinflamatórios^{162,163}.

O TNF- α é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos e também por linfócitos e mastócitos. Já a IL-1 β é produzida principalmente por macrófagos, células endoteliais, epiteliais e por linfócitos¹⁶⁴. A IL-1 β e principalmente o TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão promovendo a migração e/ou transmigração dos leucócitos para o local inflamado^{165,166}.

Em humanos, o TNF- α e a IL-1 β tem sido envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias como a asma brônquica e a artrite reumatóide^{167,168}. Em pacientes com artrite

reumatóide, estas citocinas induzem várias respostas inflamatórias, levando a inflamação, a dor e a destruição das articulações^{25,169}. Neste contexto, MAGARI et al (2003) demonstraram que o tacrolimus foi capaz de prevenir a destruição da cartilagem inibindo a produção de citocinas, como o TNF- α , em modelo de artrite induzida por colágeno, em ratos²³.

Neste nosso estudo o tacrolimus reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β no lavado pleural de camundongos com pleurisia. Corroborando com os nossos resultados, estudos realizados por SAKUMA e col (2000) revelaram que a ciclosporina A inibiu, *in vitro*, a produção de TNF- α e IL-1 β em culturas de células mononucleares de sangue periférico humano¹⁷⁰. Resultados semelhantes foram obtidos por REISMANN e col. (1995) que também demonstraram que a ciclosporina A e o tacrolimus inibiram a liberação de IL-1 β de monócitos (linhagem THP-1), após estimulação com LPS¹⁷¹. Além disso, o tacrolimus, em outro experimento *in vitro*, demonstrou ser capaz de inibir a secreção de TNF- α de queratinócitos humanos por meio da regulação do fator de transcrição nuclear NF- κ B¹⁷².

Continuando os nossos estudos, avaliamos a participação de outros mediadores pró-inflamatórios (bradicinina, a substância P, a histamina) por meio do estudo do efeito do tacrolimus sobre a migração de leucócitos induzida por estes agentes flogísticos.

Em nosso trabalho, o tacrolimus foi efetivo em inibir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, às custas de células do tipo mononucleares, na pleurisia induzida por bradicinina, em camundongos.

A bradicinina é formada em resposta a muitos tipos de lesões na resposta inflamatória e é considerada um dos principais mediadores da inflamação envolvidos na regulação da migração celular. Exemplo disso são trabalhos que demonstraram que este mediador promoveu o aumento de leucócitos para a cavidade pleural no modelo da pleurisia, em camundongos¹³³.

Os estudos sobre o efeito de imunossupressores sobre a bradicinina são poucos. Bompert et al (1996) demonstraram que a ciclosporina A reduziu a formação de caliceína e a expressão de mRNA para o receptor B₂ em células cardíacas e em córtex de rins, em ratos¹⁷³.

Em nossos experimentos observamos também que o tacrolimus reduziu de forma significativa a migração de leucócitos para a cavidade pleural na pleurisia induzida pela substância P. Neste experimento, a inibição de leucócitos foi devida à redução de polimorfonucleares na cavidade pleural. Estudos em animais demonstraram que a substância P foi capaz de reduzir a inflamação no modelo da pleurisia, em camundongos. Neste modelo houve aumento tanto da exsudação como da migração de leucócitos para a cavidade pleural inflamada¹³⁷. Um dos poucos estudos que descreveram a ação direta de um imunossupressor sobre a substância P foi documentado por GITTER et al (1995)¹⁷⁴. Neste estudo, os pesquisadores demonstraram que a ciclosporina A agiu como um antagonista inibindo a ligação da substância P no seu receptor NK₁ em amostras de pulmão de cobaias. Neste mesmo trabalho, a ciclosporina demonstrou efeito similar em experimento *in vitro* utilizando-se linfócitos B (linhagem IM-9) e astrócitos humanos (linhagem U-373 MG)¹⁷⁴.

Em relação à histamina, os resultados obtidos demonstraram que o tacrolimus foi efetivo em reduzir a migração leucocitária para a cavidade pleural inflamada pela administração de histamina diretamente na cavidade pleural. Estudos realizados por Da CUNHA et al (2001) demonstraram o efeito da histamina na indução da inflamação, no modelo de pleurisia, em camundongos¹³⁶. Neste estudo, observou-se claramente que a histamina aumentou o influxo de leucócitos para a cavidade pleural às custas de mononucleares, e também promoveu o aumento da exsudação. A inibição da ativação de mastócitos e basófilos, bem como a inibição da liberação de histamina após tratamento com tacrolimus foi descrita por SENGOKU et al (2000)¹⁷⁵. Neste experimento, utilizando-se mastócitos peritoneais de ratos e basófilos humanos, o tacrolimus foi mais efetivo em reduzir a liberação de histamina do que os esteróides ou o cromoglicato de sódio. Em outro estudo *in vitro*, utilizando-se a ciclosporina A e o tacrolimus, ambos os imunossupressores foram capazes de reduzir, de forma dose dependente, a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de camundongos em cultura celular¹⁷⁶. De PAULIS et al (1992) reportaram que o tacrolimus inibiu a liberação de histamina de mastócitos isolados de pele humana quando estimulados com anticorpos anti-IgE¹⁷⁷. A inibição da secreção de histamina também foi descrita por SPERR et al (1996). Neste experimento, tanto o tacrolimus como a ciclosporina A inibiram, *in vitro*, a liberação de histamina induzida por anticorpos IgE, por meio da inibição da célula progenitora de mastócitos humanos¹⁷⁸.

Outro mediador importante e que merece destaque é o óxido nítrico, pois este tem um papel importante no processo inflamatório, agindo como mediador pró-inflamatório, promovendo a migração de leucócitos e vasodilatação^{135,179,180}.

Em nossos experimentos, o tacrolimus não foi efetivo em inibir os níveis de nitrato e nitrito. Todavia, estudos realizados por HÄMÄLÄINEN et al (2002) demonstraram que a ciclosporina A e o tacrolimus inibiram a iNOS em células epiteliais de colon humano e macrófagos de ratos (linhagem J774)¹⁸¹. Em estudos similares, a ciclosporina A e o tacrolimus foram efetivos em inibir a transcrição de iNOS, em macrófagos peritoneais isolados de ratos (J774)^{182,183}.

Em estudos *in vitro* realizados em queratinócitos humanos e induzidos por TNF- α , o tacrolimus também foi efetivo em reduzir os níveis de iNOS liberados por estas células¹⁸⁴. Por outro lado, experimentos, *in vitro* realizados com linhagem de macrófagos RAW 264.7 e estimuladas com LPS demonstraram que o tacrolimus não teve efeito sobre a iNOS, enquanto que a ciclosporina A foi capaz de inibir a expressão dessa enzima¹⁸⁵. Outros trabalhos também têm demonstrado efeitos diversos de fármacos imunossupressores sobre a liberação de óxido nítrico. O tacrolimus e a ciclosporina A inibiram a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de ratos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS)¹⁸⁶. Por outro lado, TOUNG et al (1999) demonstraram que o tacrolimus não foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico em modelo de isquemia e reperfusão, em ratos¹⁸⁷. Além disso, estudos demonstraram que a administração de ciclosporina A, mas não do tacrolimus, reduziu os níveis séricos de nitrito/nitrato, em ratos¹⁸⁸. Desta forma, podemos concluir que o efeito do imunossupressor tacrolimus sobre o mediador pró-inflamatório óxido nítrico é controverso e depende do modelo experimental, bem como da espécie em estudo.

Outro fator importante a relatar foi que o tacrolimus não só reduziu a migração de leucócitos às custas de neutrófilos, mas também a atividade da mieloperoxidase, uma enzima considerada marcador de neutrófilos ativados.

No modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, FRODE et al (2001) observaram que o aumento da atividade da mieloperoxidase estava associado com o aumento do número de leucócitos e de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos inflamados¹³⁷.

Os nossos resultados obtidos com o tacrolimus sobre a redução da atividade da enzima MPO vão de encontro com outros estudos pelo qual também demonstraram que este fármaco diminuiu os níveis da MPO, em modelos de inflamação em animais¹⁵. SINGH et al (2003) demonstraram que a administração do tacrolimus por via oral reduziu os níveis de MPO na inflamação induzida pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos¹⁵. Da mesma forma, CETINKALE et al (1999), utilizando o modelo de inflamação induzida por queimadura em ratos, demonstraram que o tacrolimus foi efetivo em reduzir os níveis de MPO, indicando também uma redução no acúmulo de neutrófilos no local inflamado¹⁸⁹.

Uma outra importante propriedade atribuída a MPO é ativação de moléculas de adesão do tipo integrinas CD11b/CD18 expressas em polimorfonucleares. Esta interação entre a MPO e a integrina CD11b/CD18 ativa as proteínas quinases como, por exemplo, as MAP-quinases em polimorfonucleares humanos, promovendo desta forma a ativação destas células¹⁹⁰.

Desta forma podemos também supor que um dos mecanismos de ação antiinflamatória do tacrolimus é a inibição dos leucócitos, por meio da atenuação da atividade da mieloperoxidase, um marcador de células ativadas.

De forma geral, estudos têm demonstrado vários mecanismos de ação antiinflamatório do tacrolimus. Este fármaco exerce seus efeitos imunossupressores ligando-se a proteínas celulares denominadas imunofilinas, ou mais especificamente a FKBP12¹⁶. Este complexo tacrolimus-FKBP inibi a enzima calcineurina fosfatase, uma enzima envolvida na ativação do fator de transcrição nuclear (NF-AT). O NF-AT é um fator necessário para a expressão de IL-2. Por outro lado, alguns trabalhos têm demonstrado que a inibição da calcineurina fosfatase pode contribuir para a regulação de outros fatores nucleares, como o NF- κ B¹⁷⁰.

Tanto os fatores de transcrição nuclear NF-AT como o NF- κ B possuem papel central na regulação da expressão de gens que codificam moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , quemocinas (IL-8), moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) e outros mediadores pró-inflamatórios (NO)^{191,192}.

Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que o tacrolimus, neste modelo experimental, promoveu importante efeito antiinflamatório, principalmente em nível celular,

inibindo os leucócitos, bem como mediadores liberados por células. Várias hipóteses podem ser formuladas para explicar a atividade antiinflamatória deste fármaco, em nosso estudo:

1. Inibição de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1 β e TNF- α , responsáveis pela quimiotaxia de leucócitos, no modelo experimental estudado;
2. Inibição indireta de outros mediadores pró-inflamatórios (BK, HIT e SP) também reconhecidos como agentes quimiotáticos e;
3. Inibição da ativação celular por meio da inibição de enzimas pró-inflamatórias do tipo mieloperoxidase.
4. Os resultados obtidos com o tacrolimus e a dexametasona foram também semelhantes, demonstrando que provavelmente os dois fármacos possuem vias comuns de ação antiinflamatória.

Futuros estudos devem ser realizados na tentativa de melhor elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório do tacrolimus.

7 PERSPECTIVAS

1. Estudar o efeito do tacrolimus sobre a exsudação e permeabilidade vascular.
2. Estudar o efeito deste fármaco sobre a expressão de moléculas de adesão do tipo integrinas e/ou selectinas.
3. Estudar o efeito deste fármaco em relação ao fator de transcrição nuclear NF- κ B.
4. Avaliar o efeito do tacrolimus sobre diversos parâmetros inflamatórios em animais inflamados.
5. Estudar o efeito do tacrolimus sobre a expressão de mRNA para citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e quemocinas) no pulmão e no lavado pleural.

8 REFERÊNCIAS

1. Sakano T, Ohta T, Kinoshita Y, Fjiwara M, Wakai M. Treatment of steroid-resistant systemic lupus erythematosus with extremely low dose of cyclosporine A. *Pediatr Int.* 2004;46(4):468-70.
2. Borro JM, De la Torre M, Miguelez C, Fernandez R, Gonzalez D, Lemos C. Comparative study of basiliximab treatment in lung transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(9):3996-8.
3. Crespo-Leiro MG. Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(9):4018-20.
4. Podder H, Kahan BD. Individualization of immunosuppressive therapy: I. Sirolimus improves outcomes in African-American renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005;37(9):3723-6.
5. Hench PS, Kendall E, Slocumb CH et al. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: Compound E and the pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. Preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* .1949;24:181-97
6. Friedmann RM, Buckler CE, Baron S. The effect of aminomethylpteryl glutamic acid on the development of skin hypersensitivity and antibody formation in guinea pigs. *J Exp Med.* 1961;114:173-183.
7. Borel JF, Feurer C, Gubler HV. Biological effects of cyclosporine A: a new anti-lymphocytic agent. *Agents Actions.* 1976;6:468-475
8. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1256-65. (a)
9. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1249-55.(b)
10. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):63-83
11. Choi JS, Jang AS, Lee JH, Park JS, Park SW, Kim DJ et al. Effect of high dose inhaled glucocorticoids on quality of life in patients with moderate to severe asthma. *J Korean Med Sci.* 2005;20(4):586-90.
12. Schafer-Korting M, Kleuser B, Ahmed M, Holtje HD, Korting HC. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action. *Skin Pharmacol Physiol.* 2005;18(3):103-14.

13. Dalmarco EM, Frode TS, Medeiros YS. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm.* 2002;11(5):299-306.
14. Dalmarco EM, Frode TS, Medeiros YS. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transplant Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.
15. Singh A, Naidu PS, Patil CS, Kulkarni SK. Effect of FK506 (tacrolimus) in animal models of inflammation. *Inflammopharmacology.* 2003;11(3):249-57.
16. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;80(3 Pt 2):S40-5.
17. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc.* 1987;19(5 Suppl 6):4-8.
18. Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation.* 2004;77(9 Suppl):S41-3.
19. Hutchinson IV, Bagnall W, Bryce P, Pufong B, Geraghty P, Brogan I. Differences in the mode of action of cyclosporine and FK 506. *Transplant Proc.* 1998;30(4):959-60.
20. Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED et al. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123(4):756-67.
21. Senba E, Katanosaka K, Yajima H, Mizumura K. The immunosuppressant FK506 activates capsaicin- and bradykinin-sensitive DRG neurons and cutaneous C-fibers. *Neurosci Res.* 2004;50(3):257-62.
22. Karamperis N, Povlsen JV, Hojskov C, Poulsen JH, Pedersen AR, Jorgensen KA. Comparison of the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine at equivalent molecular doses *Transplant Proc.* 2003;35(4):1314-8.
23. Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. Inflammatory cytokine levels in paw tissues during development of rat collagen-induced arthritis: effect of FK506, an inhibitor of T cell activation. *Inflamm Res.* 2004;53(9):469-74.
24. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(2):195-204.
25. Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res.* 2005;54(1):1-9.
26. Alomar A, Puig L, Gallardo CM, Valenzuela N. Topical tacrolimus 0.1% ointment (protopic) reverses nickel contact dermatitis elicited by allergen challenge to a similar degree to mometasone furoate 0.1% with greater suppression of late erythema. *Contact Dermatitis.* 2003;49(4):185-8.
27. Joseph MA, Kaufman HE, Insler M. Topical tacrolimus ointment for treatment of refractory anterior segment inflammatory disorders. *Cornea.* 2005;24(4):417-20.

28. Corrigan CJ. Asthma refractory to glucocorticoids: the role of newer immunosuppressants. *Am J Respir Med.* 2002;1(1):47-54.
29. Ponseti JM, Fort JM, Espin E, Armengol M. [Tacrolimus (FK506) in the treatment of prednisone-resistant myasthenia gravis. Preliminary results of 20 cases]. *Med Clin (Barc).* 2002;118(3):117.
30. Ponseti JM, Azem J, Fort JM, Codina A, Montoro JB, Armengol M. Benefits of FK506 (tacrolimus) for residual, cyclosporin- and prednisone-resistant myasthenia gravis: one-year follow-up of an open-label study. *Clin Neurol Neurosurg.* 2005;107(3):187-90.
31. Corrigan CJ, Bungre JK, Assoufi B, Cooper AE, Seddon H, Kay AB. Glucocorticoid resistant asthma: T-lymphocyte steroid metabolism and sensitivity to glucocorticoids and immunosuppressive agents. *Eur Respir J.* 1996;9(10):2077-86.
32. Toung TJ, Bhardwaj A, Dawson VL, Dawson TM, Traystman RJ, Hurn PD. Neuroprotective FK506 does not alter in vivo nitric oxide production during ischemia and early reperfusion in rats. *Stroke.* 1999;30(6):1279-85.
33. Peeling J, Yan HJ, Corbett D, Xue M, Del Bigio MR. Effect of FK-506 on inflammation and behavioral outcome following intracerebral hemorrhage in rat. *Exp Neurol.* 2001;167(2):341-7.
34. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18(3):385-405.
35. Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1179-81.
36. Plytycz B, Seljelid R. From inflammation to sickness: historical perspective. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(2):105-9.
37. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420(6917):846-52.
38. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):881-900.
39. Hedqvist P, Gautam N, Lindbom L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(2 Pt 2):S117-9.
40. Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Carini F, Maggi CA. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides.* 2000;34(5):303-13.
41. Steeber DA, Venturi GM, Tedder TF. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *Trends Immunol.* 2005;26(1):9-12.
42. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1182-90.
43. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005;53(6):505-17.
44. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc).* 2004;69(1):4-9.
45. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317-27.

46. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.
47. Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 2005;26(3):157-65.
48. Kim HS, Kim WD, Lee, YH. Production and expression of gro-alpha and RANTES by peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with Kawasaki disease and measles. *Journal of Korean Medical Science*, v. 18, p. 381-386, 2003.
49. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical Electron Microscopy*, v. 35, p. 179-203, 2002.
50. Winterbourn CC, Kettle AJ. Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57(5):S31-3.
51. Jantschko W, Furtmuller PG, Zederbauer M, Jakopitsch C, Obinger C. Kinetics of oxygen binding to ferrous myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2004;426(1):91-7.
52. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S193-201.
53. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-6.
54. Furchgott RF, Jothianandan D, Cherry PD. Endothelium-dependent responses: the last three years. *Bibl Cardiol.* 1984;(38):1-15.
55. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-6.
56. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):3-31.
57. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(2):91-5.
58. Puhakka A, Kinnula V, Napankangas U, Saily M, Koistinen P, Paakko P et al. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. *APMIS.* 2003;111(12):1137-46.
59. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994;269(7):4705-8.
60. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002;1(4):232-41.
61. Iskit AB, Guc MO. A new therapeutic approach for the treatment of sepsis. *Med Hypotheses.* 2004;62(3):342-5.
62. Reddy SV, Wanchu A, Khullar M, Govindrajan S, Bamberg P. Leflunomide reduces nitric oxide production in patients with active rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(6):1085-90.
63. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001;15(5):831-45.

64. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000;28(4 Suppl):N3-12.
65. Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol.* 1998;76(4):300-17.
66. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm.* 2001;10(2):51-9.
67. Wong MM; Fish EM. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology.* 2003;15:5-14.
68. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 2000;85:9-18.
69. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Damme JV. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory responses. *Cytokine and growth factor Reviews.* 2005;16: 561-580.
70. Hartel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Muller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(3):446-53.
71. Benson M, Adner M, Cardell LO. Cytokines and cytokine receptors in allergic rhinitis: how do they relate to the Th2 hypothesis in allergy? *Clin Exp Allergy.* 2001;31(3):361-7.
72. Hendeles L, Asmus M, Chesrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S107-12.
73. Takagi K, Takagi M, Kanangat S, Warrington KJ, Shigemitsu H, Postlethwaite AE. Modulation of TNF-alpha gene expression by IFN-gamma and pamidronate in murine macrophages: regulation by STAT1-dependent pathways. *J Immunol.* 2005;174(4):1801-10.
74. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-147.
75. Taylor PC. Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13(3):164-9.
76. Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yokoyama T et al. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix metalloproteinase-9 induction in TNF-alpha-stimulated human hepatic stellate cells. *Life Sci.* 2005.
77. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8.
78. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(4-5):323-40.
79. Wong CK, Lam CW, Wu AK, Ip WK, Lee NL, Chan IH et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(1):95-103.
80. Glasgow SC, Ramachandran S, Csontos KA, Jia J, Mohanakumar T, Chapman WC. Interleukin-1beta is prominent in the early pulmonary inflammatory response after hepatic injury. *Surgery.* 2005;138(1):64-70.
81. Gurgoze MK, Akarsu S, Yilmaz E, Godekmerdan A, Akca Z, Ciftci I et al. Proinflammatory cytokines and procalcitonin in children with acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(10):1445-8.

82. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1 β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(4):311-8.
83. Arend, WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2001;30(5) (suppl 2):1-6.
84. Iwakura Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002;13:341-355.
85. Fleischmann R, Stern R, Iqbal I. Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Biological Therap.*, 2004;4:1333-1344.
86. Long CS. The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Failure Review*. 2001;6:81-94,
87. Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research*. 2004;78:151-156,
88. Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol*. 2002;169(11):6467-73.
89. Jan MS, Huang YH, Shieh B, Teng RH, Yan YP, Lee YT et al. CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;41(1):6-16.
90. Keane, Michael P. MD; Strieter, Robert M. MD. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med*. 2000;28(4 Suppl):N13-26.
91. Newton R, Eddleston J, Haddad el-B, Hawisa S, Mak J, Lim S et al. Regulation of kinin receptors in airway epithelial cells by inflammatory cytokines and dexamethasone. *Eur J Pharmacol*. 2002;441(3):193-202.
92. Srinivasan D, Burbach LR, Daniels DV, Ford AP, Bhattacharya A. Pharmacological characterization of canine bradykinin receptors in prostatic culture and in isolated prostate. *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):297-304.
93. Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(10):845-52.
94. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci*. 2005;99(1):6-38.
95. Stewart JM. Bradykinin antagonists: discovery and development. *Peptides*. 2004;25(3):527-32.
96. Kouyoumdjian M, Nagaoka MR, Borges DR. Kallikrein-kinin system in hepatic experimental models. *Peptides*. 2005;26(8):1301-7.
97. Xu J, Carretero OA, Sun Y, Shesely EG, Rhaleb NE, Liu YH et al. Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. 2005;45(4):747-53.

98. Blaukat, Structure and signaling pathways of kinin receptors, *Andrologia*. 2003;35:17–23.
99. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):161-76.
100. Erdos EG. Kinins, the long march--a personal view. *Cardiovasc Res*. 2002;54(3):485- 91.
101. Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett*. 1989;247(2):189-92.
102. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):8140-5.
103. Schmaier AH. Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions *Curr Opin Hematol*. 2000;7(5):261-5.
104. Ellis KM, Fozard JR. Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2002;22(1):3-16.
105. Santos DR, Calixto JB, Souza GE. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rat. *British Journal of Pharmacology*. 2003;139:271-278.
106. Sharma JN, Al-Dhalmawi GS. Bradykinin receptor antagonists: Therapeutic implications. *IDrugs*. 2003;6:581-586.
107. Von Euler, US, Gaddum, JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*. 1931;72:74-87.
108. Chang MM, Leeman SE. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and Its characterization as substance P. *J Biol Chem*. 1970;245(18):4784-90.
109. Kimura S, Goto K, Ogawa T, Sugita Y, Kanazawa I. Pharmacological characterization of novel mammalian tachykinins, neurokinin alpha and neurokinin beta. *Neurosci Res*. 1984;2(1-2):97-104.
110. Salthun-Lassalle B, Traver S, Hirsch EC, Michel PP. Substance P, neurokinins A and B, and synthetic tachykinin peptides protect mesencephalic dopaminergic neurons in culture via an activity-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*. 2005;68(5):1214-24.
111. Jiang Y, Gao G, Fang G, Gustafson EL, Lavery M, Yin Y et al. PepPat, a pattern-based oligopeptide homology search method and the identification of a novel tachykinin-like peptide. *Mamm Genome*. 2003 May;14(5):341-9. Erratum in: *Mamm Genome*. 2003;14(8):580
112. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):285-322.
113. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*. 2004;74(12):1445-63.
114. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*. 2000;1(5):392-7.

115. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR et al. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*. 2002;296(1-2):205-12.
116. Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG et al. Characterization of the endokinins: Human tachykinins with cardiovascular activity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2003;100:6245-6250.
117. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*. 2004;201(2):167-80.
118. Liu L, Burcher E. Tachykinin peptides and receptors: putting amphibians into perspective. *Peptides*. 2005;26(8):1369-82.
119. Page NM, Bell NJ. The human tachykinin NK1 (short form) and tachykinin NK4 receptor: a reappraisal. *Eur J Pharmacol*. 2002;437(1-2):27-30.
120. Campbell VA, Beddy P, Foley A, Bakhle YS, Bell C. Reduced inflammation in genetically hypertensive rat airways is associated with reduced tachykinin NK(1) receptor numbers. *Eur J Pharmacol*. 2000;401(1):109-14.
121. Springer J, Groneberg DA, Pregla R, Fischer A. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regul Pept*. 2005;124(1-3):195-201.
122. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(3):R416-26.
123. Lambert N, Lescoulie PL, Yassine-Diab B, Enault G, Mazieres B, De Preval C et al. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Immunol*. 1998;113(2):269-75.
124. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol*. 2002;23(5):255-63.
125. Voog U, Alstergren P, Leibur E, Kallikorm R, Kopp S. Immediate effects of the serotonin antagonist granisetron on temporomandibular joint pain in patients with systemic inflammatory disorders. *Life Science*, 2000;68:591-602.
126. Marone G, Granata F, Spadaro G, Genovese A, Triggiani M. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003;112:S83-S88.
127. MacGlashan DJr. Histamine: A mediator of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003;112:S53-S59.
128. Yamashiro K, Kiryu J, Tsujikawa A, Nonaka A, Honjo M, Tanihara H et al. Suppressive effects of histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine on the leukocyte infiltration during endotoxin-induced uveitis. *Exp Eye Res*. 2001;73(1):69-80.

129. Sedgwick AD, Willoughby DA. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: Handbook of inflammation. Bonta IL, Bray MA, Parnham MJ. (eds), New York: Elsevier, 1985. p. 27-47.
130. Spector WG. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1956;72:367-380,
131. Sedgwick AD, Willoughby DA. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: Textbook of immunopharmacology. New York, 1989. p. 253-261.
132. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*. 1996;118:811-819,
133. Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *European Journal of Pharmacology*. 1997;331:43-52.
134. Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*. 1999;20:949-956,
135. Fröde-Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides*. 1999;20:259-265.
136. Da Cunha FM, Fröde TS, Mendes GL, Malheiros A, Cechinel V, Yunes R et al. Additional evidence of the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences*, 2001;70:159-169.
137. Fröde TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*. 2001;10:223-227.
138. Fröde TS, Souza GE, Calixto JB. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*. 2002;17:149-156.
139. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*. 2002;96(1):23-43.
140. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16(2);109-110.
141. Campos MM, Calixto JB. Involvement of B₁ or B₂ receptors in bradykinin- induced rat paw oedema. *British Journal of Pharmacology*. 1995;144:1005-1013.
142. Rao TS, Currie JL, Shaffer AL, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 1993; 17(6);723-41.
143. Green IC, Wagner DA, Glowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SB. analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982;126:131-138,.
144. Di Rosa M, Lalenti A, Ianaro A, Sautebin L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 54(4);229-38.

145. Da Silva MB, Farges RC, Fröde TS. Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*. 2004;13:93-103.
146. Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol*. 1999;112(1):1-23
147. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1182-90.
148. Chavakis T, Kanse SM, Pixley RA, May AE, Isordia-Salas I, Colman RW, Preissner KT. Regulation of leukocyte recruitment by polypeptides derived from high molecular weight kininogen. *FASEB J*. 2001;15(13):2365-76.
149. Steeber DA, Venturi GM, Tedder TF. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *Trends Immunol*. 2005;26(1):9-12.
150. Braun M, Pietsch P, Schror K, Baumann G, Felix SB. Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 1999;41(2):395-401.
151. Oliver SJ, Cheng TP, Banquerigo ML, Brahn E. Suppression of collagen-induced arthritis by an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, in combination with cyclosporin: reduction of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cell Immunol*. 1995;166(2):196-206.
152. Ciesielski CJ, Mei J, Piccinini LA. Effects of cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. *Transpl Immunol*. 1998;6(2):122-33.
153. Wang Q, Teder P, Judd NP, Noble PW, Doerschuk CM. CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in *Escherichia coli* pneumonia in mice. *Am J Pathol*. 2002;161(6):2219-28.
154. Asako H, Kubes P, Baethge BA, Wolf RE, Granger DN. Reduction of leukocyte adherence and emigration by cyclosporine and L683,590 (FK506) in postcapillary venules. *Transplantation*. 1992;54(4):686-90.
155. Peeling J, Yan HJ, Corbett D, Xue M, Del Bigio MR. Effect of FK-506 on inflammation and behavioral outcome following intracerebral hemorrhage in rat. *Exp Neurol*. 2001;167(2):341-7.
156. O'Callaghan JW, Forrest MJ, Brooks PM. Inhibition of neutrophil chemotaxis in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 1988;8(1):41-5.
157. Kraan MC, de Koster BM, Elferink JG, Post WJ, Breedveld FC, Tak PP. Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind clinical trial in fifteen patients. *Arthritis Rheum*. 2000;43(7):1488-95.
158. Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman S. The immunomodulatory effect of topical cyclosporin A in atopic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(2):392-9.
159. Tsuzuki S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Tobita Y, Miyasaka M. FK506 (tacrolimus) inhibits extravasation of lymphoid cells by abrogating VLA-4/VCAM-1 mediated transendothelial migration. *FEBS Lett*. 1998;430(3):414-8.
160. St Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver transplantation*. 2003;9(2):105-116.

161. Sasakawa T, Sasakawa Y, Masunaga T, Fujitsu T, Hirayama Y, Ohkubo Y et al. FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor alpha secretion from peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 2005;29(2):67-71.
162. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066-71.
163. Barnes PJ, Adcock IM. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J*. 1998;12:221-34.
164. Alves AL, Ribeiro FAQ. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: Revisão da literatura. *Revistas Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2004;70:813-818,
165. Hirata N, Kohrogi H, Iwagoe H, Goto E, Hamamoto J, Fujii K et al. Exposure Induces the Expression of Endothelial Adhesion Molecules in Passively Sensitized Human Bronchus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18(1):12-20.
166. Chuluyan HE, Lang BJ, Yoshimura T, Kenney JS, Issekutz AC. Chemokine production and adhesion molecule expression by neural cells exposed to IL-1, TNF alpha and interferon gamma. *Life Sci*.;63(21):1939-52.
167. Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH et al. Evidence of a Role of Tumor Necrosis Factor (alpha) in Refractory Asthma *N Engl J Med*. 2006;354(7):697-708.
168. Bessis N, Boissier MC. Gene therapy for patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2005.
169. van den Berg WB. Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30(5 Suppl 2):7-16.
170. Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S et al. FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-alpha and IL-1beta production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol*. 2000;130(7):1655-63.
171. Reisman L, Lin WG, Martinelli GP. Modulation of interleukin-1 secretion by immunosuppressive drugs, alone and in combination. *Transpl Immunol*. 1995;3(1):45-9.
172. Lan CC, Yu HS, Wu CS, Kuo HY, Chai CY, Chen GS. FK506 inhibits tumour necrosis factor-alpha secretion in human keratinocytes via regulation of nuclear factor-kappaB. *Br J Dermatol*. 2005;153(4):725-32.
173. Bompard G, Tack I, Castano EM, Pesquero JB, Girolami JP, Bascands JL. Cyclosporine A decreases kallikrein and BK2 mRNA expression in the rat renal cortex. *Immunopharmacology*. 1996;32(1-3):99-101.
174. Gitter BD, Waters DC, Threlkeld PG, Lovelace AM, Matsumoto K, Bruns RF. Cyclosporin A is a substance P (tachykinin NK1) receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 1995;289(3):439-46.
175. Sengoku T, Kishi S, Sakuma S, Ohkubo Y, Goto T. FK506 inhibition of histamine release and cytokine production by mast cells and basophils. *Int J Immunopharmacol*. 2000;22(3):189-201.

176. Toyota N, Hashimoto Y, Matsuo S, Kitamura Y, Iizuka H. Effects of FK506 and cyclosporin A on proliferation, histamine release and phenotype of murine mast cells. *Arch Dermatol Res.* 1996;288(8):474-80.
177. de Paulis A, Stellato C, Cirillo R, Ciccarelli A, Oriente A, Marone G. Anti-inflammatory effect of FK-506 on human skin mast cells. *J Invest Dermatol.* 1992;99(6):723-8.
178. Sperr WR, Agis H, Czerwenka K, Virgolini I, Bankl HC, Muller MR et al. Effects of cyclosporin A and FK-506 on stem cell factor-induced histamine secretion and growth of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(2):389-99.
179. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep.* 2005;57 Suppl:108-19.
180. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):3-31.
181. Hamalainen M, Lahti A, Moilanen E. Calcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. *Eur J Pharmacol.* 2002;448(2-3):239-44.
182. Hattori Y, Nakanishi N. Effects of cyclosporin A and FK506 on nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages. *Cell Immunol.* 1995;165(1):7-11.
183. Dusting GJ, Akita K, Hickey H, Smith M, Gurevich V. Cyclosporin A and tacrolimus (FK506) suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms. *Br J Pharmacol.* 1999;128(2):337-44.
184. Lan CC, Kao YH, Huang SM, Yu HS, Chen GS. FK506 independently pre-regulates transforming growth factor beta and down-regulates inducible nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes: possible mechanisms of how tacrolimus ointment interacts with atopic skin. *Br J Dermatol.* 2004;151(3):679-84.
185. Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P et al. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res.* 2000;49(1):20-6.
186. Strestikova P, Otova B, Filipce M, Farghali H. Inhibitory effect of FK 506 and cyclosporin A on nitric oxide production by LPS-treated cultured rat macrophages. *Physiol Res.* 2000;49(6):725-8.
187. Toung TJ, Bhardwaj A, Dawson VL, Dawson TM, Traystman RJ, Hurn PD. Neuroprotective FK506 does not alter in vivo nitric oxide production during ischemia and early reperfusion in rats. *Stroke.* 1999;30(6):1279-85.
188. Watarai Y, Morita K, Shimoda N, Miura M, Yoshioka M, Togashi H et al. Effect of tacrolimus and cyclosporine on renal microcirculation and nitric oxide production. *Transplant Proc.* 2004;36(7):2130-2.
189. Cetinkale O, Konukoglu D, Senel O, Kemerli GD, Yazar S. Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns.* 1999;25(2):105-12.

- 190.Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(2):431-6.
- 191.Tsoufas G, Geller DA. NF-kappaB in transplantation: friend or foe? *Transpl Infect Dis.* 2001;3(4):212-9.
- 192.Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S414-6.

9 NORMAS ADOTADAS

Ficha catalográfica (descritores):

BIREME – Centro Latino-Americano e do Caribe de informações em Ciências da Saúde.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde: Bireme, 2004.

Relatório:

Normas para elaboração de Dissertação do Curso de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências Médicas. Florianópolis-SC, 2001.

Referências:

Normas do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (Vancouver).

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Inter Med*, 1997, 126:36-47.

D'Acampora AJ. *Investigação Experimental: do planejamento à redação final*. Florianópolis: Papa-Livro, 2001.