

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MEDIADORES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PLEURISIA INDUZIDA
PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

**TÂNIA SILVIA FRÖDE
Florianópolis
2000**

FRÖDE, Tânia. MEDIADORES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS . Florianópolis, 2000. 176p. Dissertação (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: João Batista Calixto

Defesa: 28/04/2000

O modelo da [pleurisia] induzida pela [carragenina] (1%), apresenta resposta inflamatória bifásica (4 e 48 h) na cavidade pleural de [camundongos]. A L-NOARG, o HOE 140, o NPC 17731, a diacereína, a indometacina, o meloxicam, a nabumetona e a dexametasona administrados 30 min antes da [carragenina], inibiram a migração celular e os níveis da [mieloperoxidase] na primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória. Todas as drogas, com exceção da diacereína, inibiram a exsudação. Além disso, a diacereína, a nabumetona, a L-NOARG e a L-NAME inibiram também os níveis de [nitrito/nitrato]. Em relação à segunda fase (48 h), observou-se que a dexametasona e a diacereína, inibiram os leucócitos, enquanto que a terfenadina reduziu apenas a exsudação. Nenhuma das drogas estudadas reduziu os níveis da [mieloperoxidase] ou do [nitrito/nitrato]. O NPC 17731, o HOE 140 e o NPC 18884 inibiram tanto a exsudação como a migração celular induzida pela [carragenina], 4 h. Neste modelo experimental observa-se a participação de [citocinas] com efeitos pró-inflamatórios (TNF α , IL-1 β , IL-8) e antiinflamatórios (IL-6, IL-10), com base nos resultados de que tanto anticorpos-policlonais como citocinas-recombinantes, administrados diretamente na cavidade pleural juntamente com a [carragenina], reproduziram parcialmente seus efeitos pró-inflamatórios ou antiinflamatórios. Neste modelo de inflamação, o PDTC e a sulfasalazina (inibidores do fator de transcrição nuclear [NF- κ B]), foram eficazes em inibir a resposta inflamatória induzida pela [carragenina] (4 h). Além disso, a associação de doses subliminares de drogas antiinflamatórias e dos inibidores (PDTC ou sulfasalazina) que isoladamente não foram eficazes, quando associados, mostraram efeito antiinflamatório sinérgico, inibindo tanto a migração celular como a exsudação na [pleurisia] induzida pela [carragenina] (4 h). Nestes experimentos observou-se também aumento da expressão de células [CD18] positivas, na cavidade pleural e no pulmão, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela [carragenina]. Além disso, no modelo experimental estudado, não se observou resposta inflamatória sistêmica caracterizada por aumento da permeabilidade vascular nos pulmões e no baço, em que se pese o aumento da molécula de adesão [CD18] em células pulmonares.

[Carragenina], [Nitrito/nitrato], [Mieloperoxidase], [NF- κ B], [Citocinas], [Pleurisia], [Camundongos].

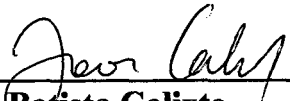
**“ MEDIADORES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PLEURISIA
INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS”.**

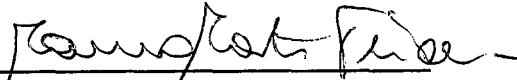
POR

TÂNIA SILVIA FRÖDE


**Tese julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



João Batista Calixto (FMC/UFSC-Membro-Titular)


Mauro Martins Teixeira (UFMG) -Membro Titular)


Glória Emília Petto de Souza (USP/RP-Membro Titular)


Jamil Assreuy Filho (FMC/UFSC-Membro Titular)


Rosa M. R. do Valle Nicolau (FMC/UFSC-Membro Titular)


Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 28 de Abril de 2000.

Ao meu pai, **Heinz Arthur Fröde (in memorium)**,
pela vida a mim dedicada, formação e
amor sempre presente.

À minha mãe, **Gildacy Fröde** e irmã, **Regina M. Fröde Machado Vieira**,

pela formação, simplicidade, incentivo,

amor sempre presente e apoio.

À profa **Yara S. Medeiros**, pela formação científica,
valiosos ensinamentos e amizade sincera.

- Ao Prof. **João B. Calixto** por ter permitido o meu ingresso no curso de Pós-Graduação, em nível de Doutorado .

- Aos bioquímicos e técnicos dos setores de Hematologia e Bioquímica Clínica do Hospital Universitário da Universidade federal de Santa Catarina, pela alegria, carinho sempre presentes e disposição em ajudar.

- Aos funcionários do setor de Citometria de Fluxo do laboratório Santa Luzia, pelos ensinamentos, carinho e disposição em ajudar.

- Aos alunos do curso de Pós-Graduação, pelos objetivos comuns que juntos buscamos na concretização dos nossos ideais.

- Aos professores e funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pelo agradável convívio.

- A amiga Clarmi pelo carinho, amizade sincera e principalmente disposição em ajudar.

- A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE	PÁG.
LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA.....	3
1.2 FENÔMENOS CELULARES DA INFLAMAÇÃO.....	5
1.2.1 <i>Função dos neutrófilos e dos fagócitos mononucleares</i>	5
1.2.2 <i>Fagócitos mononucleares</i>	8
1.3 MOLÉCULAS DE ADESÃO	9
• Moléculas de adesão nas células endoteliais e leucócitos.....	9
1.4 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO.....	12
1.4.1 EICOSANÓIDES.....	12
1.4.1.1 A VIA DA CICLOOXIGENASE.....	13
• POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DA COX-2.....	14
1.4.1.2 VIA DA LIPOOXIGENASE.....	16
1.4.2 CININAS.....	18
1.4.3 ÓXIDO NÍTRICO.....	22
1.4.4 CITOCINAS.....	25
1.4.4.1 RECEPTORES DAS CITOCINAS.....	28
1.4.4.2 CITOCINAS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	30
1.4.5 PARTICIPAÇÃO DO NF-KAPPA B NA INFLAMAÇÃO.....	35
2 OBJETIVOS.....	40

2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
2.2.1 Na resposta inflamatória da cavidade pleural.....	40
2.2.2 Na resposta inflamatória sistêmica.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 ANIMAIS.....	43
3.2 MODELO DE INFLAMAÇÃO UTILIZADO.....	43
3.2.1 <i>Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos</i>	43
3.2.2 <i>Pleurisia induzida pela bradicinina, pela desArg⁹-BK, pela histamina e pela substância P, em camundongos</i>	44
3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS.....	45
3.3.1 <i>Determinação do exsudato na cavidade pleural</i>	45
3.3.2 <i>Determinação da permeabilidade vascular em tecidos</i>	45
3.3.3 <i>Contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade pleural e no sangue total</i>	46
3.3.4 <i>Determinação da mieloperoxidase nas amostras colhidas do lavado pleural</i>	47
• <i>Método quantitativo</i>	47
• <i>Método imunohistoquímico</i>	48
3.3.5 <i>Análise quantitativa do nitrito/nitrato nas amostras colhidas do lavado pleural</i>	48
3.3.6 <i>Determinação dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25) no lavado pleural e no sangue total de animais com pleurisia</i>	50
3.3.7 <i>Determinação dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) em tecidos de animais com pleurisia</i>	51
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	52
3.4.1 <i>Determinação das concentrações da mieloperoxidase e de nitrito/nitrato no lavado pleural</i>	52

3.4.2 Efeitos de drogas antiinflamatórias sobre os níveis da mieloperoxidase e do nitrito/nitrato.....	53
3.4.3 Análise farmacológica do efeito de antagonistas peptídicos e não-peptídicos do receptor B ₂ da bradicinina, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina.....	54
3.4.4 Análise da participação de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina.....	56
3.4.5 Análise da participação do fator de transcrição nuclear NF-kappa B, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina.....	57
A-) Efeito de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (PDTC: pirrolidineditiocarbamato e sulfasalazina).....	57
B-) Efeito da associação de doses subliminares de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (PDTC e sulfasalazina) com drogas antiinflamatórias.....	58
3.4.6 Estudos dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25) no lavado pleural e no sangue total de animais com pleurisia	58
3.4.7 Estudo dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) em tecidos de animais com pleurisia	59
3.5 DROGAS.....	59
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Análise da resposta inflamatória local no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	62
4.1.1 Evidências da participação da mieloperoxidase e do óxido nítrico.....	62
A-) Análise quantitativa, imunohistoquímica e farmacológica.....	62
B-) Efeitos de drogas antiinflamatórias sobre os níveis de nitrato e da mieloperoxidase.....	67
4.1.2 Evidências da participação do receptor B ₂ da bradicinina.....	71
4.1.3 Evidências da participação de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) em ambas as fases (4 e 48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina.....	80
4.1.4 Evidências da participação do fator de transcrição nuclear NF-kappa B	94

A-) <i>Análise do efeito de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (PDTC e sulfasalazina)</i>	94
B-) <i>Efeito da associação de doses subliminares de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (PDTC e sulfasalazina) com drogas antiinflamatórias</i>	97
4.1.5 <i>Análise dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25) na reposta inflamatória local</i>	97
• <i>Na cavidade pleural de animais com pleurisia induzida pela carragenina</i>	97
4.1.6 <i>Análise da resposta inflamatória sistêmica no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos</i>	100
• <i>Análise da permeabilidade vascular em animais com pleurisia</i>	100
4.1.7 <i>Análise dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) no sangue total e em tecidos (pulmão e baço) de animais com pleurisia</i>	100
5 DISCUSSÃO.....	104
6 CONCLUSÕES.....	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

LISTA DE ABREVIÇÕES

AA	Ácido araquidônico
aa	Aminoácido
ANCA	Anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos
anti	Anticorpos
AP-1	Proteína ativadora tipo 1
ATCC	<i>American type cell culture</i>
B ₁	Receptor das cininas tipo 1
B ₂	Receptor das cininas tipo 2
B ₃	Receptor das cininas tipo 3
BK	Bradicinina
°C	Graus centígrados
Ca ⁺²	Cálcio
CAMs	Moléculas de adesão
Cav.	cavidade
C3a	Fração do sistema complemento com atividade quimiotática e de anafilatoxina
C5a	Fração do sistema complemento com atividade quimiotática e de anafilatoxina
C5b	Fração do sistema complemento
C6	Fração do sistema complemento
C9	Fração do sistema complemento
CD	Designação celular (Cluster designation)
CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares
CD11a/CD18	Moléculas de adesão, da família das integrinas, expressas em leucócitos
cm	centímetros
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl ⁻	Ânion cloreto

CNTF	Fator neurotrófico ciliar (ciliary neurotrophic factor)
COX	Ciclooxigenase
DI ₅₀	Dose necessária para inibir 50% do efeito máximo causado pelo agonista
Des-Arg ⁹ -BK	Des-Arg ⁹ -bradicinina
DNA	Ácido deoxirribonucleico
EC	<i>Escherichia coli</i>
E.D.T.A	Ácido etilenodiaminotetracético
e.p.m.	Erro padrão da média
E.U.A.	Estados Unidos da América
FACScan	Separador de células com ativação fluorescente (<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>)
FALS	<i>Forward angle light scatter sensor</i>
FGF _a	Fator de crescimento ácido do fibroblasto
FGF _b	Fator de crescimento básico do fibroblasto
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos
GMPc	Monofosfato cíclico de 3'-5'guanosina
GRO	Fator relacionado ao crescimento
h	Hora
H ₁	Receptor da histamina tipo 1
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
HOCl	Ácido hipocloroso
HPETE	Ácido hidroxiperoxieicosatetraenóico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IFN	Interferon
IκB	Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
IgE	Imunoglobulina E

I.T.C.F.	Isotiocianato de fluoresceína
IL	Interleucina
IL1-RA	Antagonista do receptor da interleucina-1
IFN	Interferom
IP	Proteína induzida pelo interferom
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Kg	Quilograma
KD	Quilodalton
LC	Limite de confiança
LFA-1	Molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas (<i>leukocyte function associated antigen</i>)
LIF	Fator inibitório leucêmico
LTs	Leucotrienos
LPS	Lipopolissacáride
Lisil-BK (Lys-BK)	Calidina
Mac-1	Molécula de adesão da família das integrinas (macrophage-1-antigen)
MCP	Proteína Quimiotática de monócitos
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófago
mg	Miligrama
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
min	Minuto
ml	Mililitros
mm	Milímetros
μl	Microlitro
μ	Micromolar
mU	Miliunidades
NaHCO ₃	Carbonato de sódio

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
NKA	Neurocinina A
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOc	Óxido nítrico constitutiva
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS _e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS _n	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS _i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS I	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS II	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS III	Óxido nítrico sintase induzida
OSM	Oncostatina M
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
PAF-acéter	Fator ativador de plaquetas
PBS	Salina fosfato tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDTC	Pirrolidineditiocarbamato
PeCAm	Molécula de adesão relacionada à plaquetas (platelet endothelial cell adhesion molecule-1)
PF	Fator plaquetário
PGI	Prostaglandina I ₂ (prostaciclina)

PGs	Prostaglandinas
PL	Fosfolipase
RANTES	Moléculas de adesão (<i>regulated upon activation in normal T-cells, expressed and secreted</i>)
RNAM	Ácido ribonucleico mensageiro
SARA	Síndrome da angústia respiratória
SIDA	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
SDF	Fator derivado do estroma
SDL	Síndrome da deficiência de adesão dos leucócitos
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TGF	Fator de crescimento tumoral
TH	Subpopulação de linfócitos T
TNF	Fator de necrose tumoral
TXs	Tromboxanos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UI	Unidades internacionais
UV	Ultra violeta
VCAM	Moléculas de adesão vascular
VLA-4	Molécula de adesão (<i>very late antigen</i>)
v.o.	Via oral
vol	Volume

LISTA DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1 - Perfil temporal dos níveis da mieloperoxidase e do nitrato, na pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos.....	63
Figura 2 - Esfregaços do lavado pleural, corados através da técnica de Graham-Knoll, mostrando os grânulos de mieloperoxidase, corados em amarelo-ouro, na pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos.....	64
Figura 3 - A- Efeito de diferentes doses da L-NOARG, administrada 30 min antes, da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito da L-NOARG (100 pmol/cav., 0,5-48 h antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	66
Figura 4 - Efeito de diferentes drogas sobre os níveis da mieloperoxidase (A e C) e do nitrato (C e D), na pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos.....	69
Figura 5- Efeito de diferentes doses do NPC 17731, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do NPC 17731 (1 pmol/cav., 0,5-48 h antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	72
Figura 6- Efeito de diferentes doses do HOE 140, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do HOE 140 (1 pmol/cav., 0,5-48 h antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	73
Figura 7- Efeito de diferentes doses do NPC 18884, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do NPC 18884 (300 nmol/kg, i.p., 0,5-8 h antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	75

Figura 8- Efeito de diferentes doses do NPC 18884, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do NPC 18884 (1200 nmol/kg, v.o., 0,5-8 h antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	76
Figura 9- Efeito de diferentes doses do NPC 18884, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do NPC 18884 (100 nmol/kg, i.p., 0,5-4 h antes) da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos.....	78
Figura 10- Efeito de diferentes doses do NPC 18884, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do NPC 18884 (300 nmol/kg, v.o., 0,5-4 h antes) da pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h), em camundongos.....	79
Figura 11- Efeito de diferentes doses do $TNF\alpha$, administrado 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	81
Figura 12- - Efeito de diferentes doses do anti- $TNF\alpha$, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	83
Figura 13- Efeito de diferentes doses da $IL-1\beta$, administrada 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	84
Figura 14- Efeito de diferentes doses do anti- $IL-1\beta$, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	85
Figura 15- Efeito de diferentes doses do $IL1-RA$, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	87

Figura 16- Efeito de diferentes doses da IL-8, administrada 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	88
Figura 17 Efeito de diferentes doses do anti-IL-8, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	89
Figura 18- Efeito de diferentes doses da IL-6, administrada 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	91
Figura 19- Efeito de diferentes doses do anti-IL-6, administrado 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	92
Figura 20- Efeito de diferentes doses da IL-10, administrada 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav.), 4 h (A) e 48 h (B), em camundongos.....	93
Figura 21- Efeito de diferentes doses do PDTC, administrado 60 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito do PDTC (100 mg/kg, i.p., 5-120 min antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	95
Figura 22- Efeito de diferentes doses da sulfasalzina, administrado 60 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%/cav., 4 h), em camundongos. B- Efeito da sulfasalazina (200 mg/kg, i.p., 5-120 min antes) da pleurisia induzida pela carragenina (1%, 4 h), em camundongos.....	96
Figura 23- Percentual dos linfócitos CD11a e CD18, na cavidade pleural (A), no pulmão (B), no sangue total (C) e no baço (D), obtidos de animais-controle (C) e com pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongos.....	101

-
- Figura 24- Análise pela citometria de fluxo de leucócitos CD18 positivos da cavidade pleural de animais-controle (C) e com pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongos..... 102
- Figura 25- Análise pela citometria de fluxo de leucócitos CD18 positivos do pulmão de animais-controle (C) e com pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongos..... 103

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1 - Liberação de citocinas segundo clones de células T (CD4+) adaptado de Howard, et al., 1993b.....	26
Tabela 2 - Classificação das citocinas de acordo com a função biológica adaptada de Galanaud, 1997.....	27
Tabela 3 - O possível potencial clínico de citocinas humanas no diagnóstico e no tratamento de diversas patologias adaptado de MAINI et al.,1993; GALANAUD, 1997.....	31
Tabela 4 - Efeito do tratamento prévio de animais com várias drogas na primeira fase (4 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos.....	68
Tabela 5 - Efeito do tratamento prévio de animais com várias drogas na Segunda fase (48 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos.....	70
Tabela 6 - Efeito da associação de doses subliminares do inibidor do fator nuclear NF-Kappa B (PDTC) e de drogas antiinflamatórias, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos (4 h).....	98
Tabela 7 Efeito da associação de doses subliminares do inibidor do fator nuclear NF-Kappa B (sulfasalazina) e de drogas antiinflamatórias, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos (4 h).....	99

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as respostas inflamatórias local (cavidade pleural) e sistêmica (sangue, pulmão, rim e baço), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Os parâmetros inflamatórios analisados foram: migração celular, grau de exsudação, quantificação dos níveis de mieloperoxidase e de nitrito/nitrato, determinação de antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45), além da permeabilidade vascular em tecidos (pulmão, coração, baço e rim).

Os resultados deste estudo demonstraram que:

- 1- No modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos, que apresenta padrão bifásico da resposta inflamatória (4 e 48 h), observou-se aumento significativo no nível de mieloperoxidase e do nitrito/nitrato, com picos em 4 e 6 h e 4 e 48 h, respectivamente ($P < 0,01$).
- 2- A L-NOARG administrada 30 min antes da carragenina inibiu significativamente tanto a migração celular como a exsudação na primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória ($P < 0,01$). A duração do efeito inibitório causada pela L-NOARG foi de até 24 h ($P < 0,01$).
- 3- Utilizando o mesmo protocolo experimental, a terfenadina, o HOE 140, o NPC 17731, a diacereína, a indometacina, o meloxicam, a nabumetona e a dexametasona, administrados 30 min antes da carragenina, inibiram significativamente a migração de leucócitos e os níveis da mieloperoxidase na

primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória ($P < 0,01$). Todas as drogas, com exceção da diacereína, inibiram a exsudação ($P < 0,05$). Além disso, a diacereína, a nabumetona, a L-NOARG e a L-NAME causaram inibição significativa nos níveis de nitrito/nitrato ($P < 0,01$). Em relação à segunda fase (48 h), observou-se que a dexametasona e a diacereína, inibiram a migração celular, enquanto que a terfenadina reduziu apenas a exsudação ($P < 0,05$). Nenhuma das drogas estudadas reduziu os níveis da mieloperoxidase ou do nitrito/nitrato.

4- O NPC 17731, o HOE 140 e o NPC 18884 (antagonistas do receptor B_2 da bradicinina) inibiram tanto a exsudação como a migração celular induzida pela carragenina, 4 h ($P < 0,01$). A duração do efeito inibitório das drogas foi: NPC 17731 (de 4 a 48 h); HOE 140 (até 24 h); NPC 18884 (até 4 h) ($P < 0,01$). Além disso, O NPC 18884, administrado por via oral e/ou intraperitoneal, foi efetivo em inibir a exsudação e a migração celular na pleurisia induzida pela bradicinina, mas não na pleurisia induzida pela desArg⁹-BK, histamina ou substância P.

5- O tratamento prévio (5 min) dos animais com $TNF\alpha$, IL-1 β ou IL-8 promoveu aumento da exsudação em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina ($P < 0,05$). Além disso, o $TNF\alpha$ e a IL-1 β , diminuíram, enquanto a IL-8 aumentou a migração celular na primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória ($P < 0,01$). Em relação à segunda fase (48 h), estas

mesmas citocinas não alteraram ou aumentaram a resposta inflamatória induzida pela carragenina ($P < 0,01$). Os anticorpos anti-TNF α , anti-IL-1 β ou anti-IL-8, administrados 30 min antes, da carragenina diminuíram tanto a exsudação como a migração celular 4 h após a administração do agente irritante ($P < 0,05$). Em relação a segunda fase (48 h) desta resposta inflamatória, estes mesmos anticorpos potencializaram ou não tiveram efeito. O IL1-RA administrado 30 min antes da carragenina inibiu a migração de leucócitos e a exsudação 4 e 48 h após a administração do agente flogístico ($P < 0,05$). A IL-6 e a IL-10, administradas 5 min antes da carragenina, inibiram a migração celular e a exsudação 4 h após a administração da carragenina ($P < 0,01$). Na segunda fase (48 h), a IL-6 inibiu tanto a exsudação como os leucócitos ($P < 0,01$). Já a IL-10 não alterou a resposta inflamatória induzida pela carragenina. O anticorpo anti-IL-6 aumentou a exsudação e diminuiu a migração celular 4 h após a injeção do agente flogístico ($P < 0,01$). Na segunda fase (48 h), este anticorpo aumentou os parâmetros inflamatórios estudados.

- 6- O PDTC e a sulfasalazina (inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B) administrados 1 h antes da carragenina inibiram tanto a exsudação como a migração celular na primeira fase (4 h) desta resposta inflamatória ($P < 0,01$). A duração do efeito inibitório das drogas estudadas foi: para o PDTC de 60 a 120 min e de 30 a 120 min para a sulfasalazina. Em relação à segunda fase (48 h), nenhuma das drogas estudadas foi capaz de inibir o

processo inflamatório induzido pela carragenina. Além disso, a administração de doses subliminares do PDTC ou da sulfasalazina com drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais inibiram os parâmetros inflamatórios estudados 4 h após a administração da carragenina ($P < 0,01$).

- 7- Em outra série de experimentos, observou-se aumento significativo de células CD18 positivas no exsudato, e no pulmão nas duas fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina ($P < 0,05$). Já, em amostras de sangue total não foi observado alteração significativa deste marcador leucocitário. Além disso, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, não houve aumento da permeabilidade vascular nos tecidos estudados (pulmão, coração, baço e rim).

Em conjunto os resultados apresentados sugerem que:

- 1- No modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos ocorre a participação: *i*) do óxido nítrico, tendo em vista que se pôde observar, aumento das concentrações de nitrito/nitrato em ambas as fases (4 e 48 h) - inibidores específicos das vias de síntese do óxido nítrico, L-NOARG e L-NAME, reduziram a migração celular e a exsudação induzida pela carragenina (4 h); *ii*) da mieloperoxidase, visto ter-se observado aumento dos níveis deste marcador 4 e 6 h após a indução da pleurisia.
- 2- A resposta inflamatória induzida pela carragenina é, em parte, mediada pela liberação de bradicinina e histamina, uma vez que antagonistas seletivos dos

receptores B₂ da BK (HOE 140, NPC 17731 e NPC 18884) ou do receptor H₁ da histamina (terfenadina) inibiram de forma significativa a resposta inflamatória induzida por este agente flogístico. Além disso, observou-se também a participação de prostaglandinas, visto que, inibidores não-seletivos da via da ciclooxygenase (indometacina, nabumetona e dexametasona) inibiram a resposta inflamatória estudada.

- 3- Neste modelo de inflamação, as citocinas TNF α , IL-1 β e IL-8 possuem efeito pró-inflamatório, enquanto a IL-6 e a IL-10 participam desta resposta inflamatória como citocinas do tipo antiinflamatórias.
- 4- O fator de transcrição nuclear (NF-Kappa B) parece possuir papel importante na resposta inflamatória induzida pela carragenina, tendo em vista que dois inibidores deste fator inibiram significativamente a primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina. Além disso, a associação de doses subliminares dos inibidores citados com drogas esteroidais e não esteroidais, que não se mostraram eficientes isoladamente, causou efeito sinérgico antiinflamatório na pleurisia induzida pela carragenina (4 h), em camundongos.
- 5- Observou-se também a participação de moléculas de adesão do tipo CD18 na pleurisia induzida pela carragenina, evidenciado tanto na primeira (4 h) como na segunda (48 h) fases desta resposta inflamatória, caracterizado por

aumento da expressão dessas moléculas, tanto na cavidade pleural como no pulmão de camundongos com pleurisia.

- 6- Finalmente, não foi observado resposta inflamatória sistêmica do tipo aumento da permeabilidade vascular nos pulmões e baço, em que se pese o aumento da molécula CD18 em células pulmonares, sendo a migração celular de mononucleares e de neutrófilos dependente da expressão de moléculas CD18 e não de CD11a.

- 7- Através do nosso trabalho são propostos diferentes protocolos experimentais que permitem estudar modelos de inflamação, como por exemplo, a pleurisia induzida pela carragenina que pode ser útil para o estudo de drogas com perfil antiinflamatório.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the local (pleural cavity) and systemic (blood, lung, kidney and spleen) inflammatory response induced by carrageenan (1%) in the mouse model of pleurisy. In this model, we analysed: cell migration and exsudation, myeloperoxidase and nitrite/nitrate levels. We also carried out cytometry analysis (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) on cells from blood, exsudate or tissue (spleen or lung), and, the case of lung, heart, spleen or kidney, we calculated the degree of fluid exsudation.

The results of this study showed that:

- 1- In the pleurisy induced by carrageenan, that presents a biphasic profile by an early (4 h) and late (48 h) phase of the inflammatory reaction, there occurred a significant increase in myeloperoxidase levels which peaked at 4 and 6 h, whereas increased mean nitrite/nitrate levels were detected at 4 and 48 h after pleurisy induction ($P < 0.01$).
- 2- L-NOARG, administered 30 min prior to carrageenan, caused a significant inhibition of cell influx and fluid leakage in the mouse pleural cavity at 4 h ($P < 0.01$). This drug exerted a long-lasting inhibitory effect on both exsudation and leukocytes ($P < 0.01$) when administered 0.5 to 24 h before pleurisy induction.
- 3- Enhancement of both cell migration and myeloperoxidase levels, 4 h after pleurisy induction, was effectively inhibited by terfenadine, HOE 140, NPC 17731, diacerein, indomethacin, meloxicam nabumetone or dexamethasone

($P < 0.01$). All, except diacerein, also inhibited exsudation ($P < 0.05$). At this time, nabumetone, diacerein, L-NOARG and L-NAME also significantly reduced nitrite/nitrate levels at 4 h ($P < 0.01$). However, regarding the second phase (48 h), although dexamethasone, diacerein and terfenadine decreased either cell migration or exsudation, respectively ($P < 0.05$). No drugs caused any change in the levels of nitrite/nitrate.

4- NPC 17731, HOE 140 or NPC 18884 (bradykinin B₂ receptor antagonists) inhibited both exsudation and cell influx 4 h after pleurisy induction by carrageenan. The inhibitory effects of these drugs were: NPC 17731 (4 to 48 h), HOE 140 (up to 24 h), NPC 18884 (up to 4 h) ($P < 0.01$). NPC 18884 (non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist) given intraperitoneally or orally inhibited bradykinin-induced pleurisy. Furthermore, the NPC 18884 were selective for bradykinin B₂ receptors; at the studied doses it had no effect against the inflammatory responses induced by des-Arg⁹-BK, histamine or substance P.

5- Intrapleural injection of TNF α , IL-1 β , or IL-8, 5 min prior to carrageenan, caused graded increase in exsudation according to assessment during the early (4 h) and late (48 h) phases of the carrageenan responses ($P < 0.05$). In contrast, intrapleural injection of both TNF α and IL-1 β or IL-8 markedly reduced or increased total and differential cell migration at 4 h, with little or no effect on the late (48 h) phase of the carrageenan-induced pleurisy ($P < 0.01$). The

antibodies against $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$, or IL-8 , injected 30 min prior to carrageenan, reduced both carrageenan-induced exudation and cell migration in relation to the early (4 h) phase, but potentiated or had no effect against the late (48 h) phase of carrageenan response ($P < 0.05$). The natural IL-1 receptor antagonist IRA, given 30 min prior to carrageenan, almost completely attenuated the fluid leakage and total and differential cell migration in relation to the early (4 h) and late (48 h) phases of the carrageenan responses ($P < 0.05$). Intrapleural injection of IL-6 , 5 min prior to carrageenan, markedly reduced total cell migration and exudation at 4 and 48 h, whereas, IL-10 was effective in inhibiting the studied parameters only in the first (4 h) phase of this inflammatory process ($P < 0.01$). Furthermore, the antibody against IL-6 , injected 30 min prior to carrageenan, reduced, in a graded manner, carrageenan-induced leukocyte in relation to the early (4 h) phase, but potentiated the cell influx and exudate in the second (48 h) phase of carrageenan response ($P < 0.01$).

6- PDTC or sulfasalazine almost completely inhibited the exudation and leukocyte infiltration induced by intrapleural administration of carrageenan when assessed 4 h (but not 48 h) after the irritant injection ($P < 0.01$). The inhibitory effects of these drugs were: PDTC (60 to 120 min), sulfasalazine (30 to 120 min). Furthermore, the combination of subliminal doses of PDTC or sulfasalazine with steroidal or non-steroidal anti-inflammatory drugs, which

alone had no anti-inflammatory action, greatly inhibited both the pleural cell infiltration and exsudation induced by carrageenan ($P < 0.01$).

7- In another set of experiments, an increase of CD18 positive cells either into the pleural cavity or into the lung (but not in the blood) were observed in both phases (4 and 48 h) after pleurisy induction ($P < 0.05$). In the mouse model of pleurisy, no changes of the Evans blue dye extravasation in the spleen and lung were observed.

These results indicate that:

- 1- In the mouse model of pleurisy, different mediators participate. Examples are: *i*) nitric oxide, on account of the fact that increased mean nitrite/nitrate levels were detected in both phases (4 and 48 h) of inflammatory response induced by carrageenan; non-selective inhibitors of NOS, L-NOARG and L-NAME, caused a significant inhibition of cell influx and exsudation in the first phase (4 h) of carrageenan-response; *ii*) myeloperoxidase, because higher levels of this enzyme were detected 4 and 6 h after carrageenan-induced-pleurisy .
- 2- The inflammatory response induced by carrageenan in the mouse pleural cavity is mediated, in part, by release of bradykinin and histamine, explained by the fact that bradykinin B₂ receptor antagonists or histamine H₁ receptor antagonist caused a significant inhibition of the inflammatory reaction induced by carrageenan.

- 3- We demonstrated that IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 or IL-10 had a pro-or anti-inflammatory profile in the mouse model of pleurisy. Furthermore, these cytokines are potential mediators of the inflammatory reaction caused by carrageenan in the pleural space, and might somehow be involved in the early (4 h) and late (48 h) phases of this response by promoting or controlling the vascular and/or cellular events.
- 4- The nuclear factor NF- κ B play a pivotal role in the modulation of the mouse pleural inflammatory response induced by carrageenan. This response results from the fact that, PDCT and sulfasalazine, two reported NF- κ B inhibitors, greatly inhibit the pleural inflammatory response induced by carrageenan in mice. Also, the treatment of animals with combinations of subliminal doses of NF- κ B inhibitors and steroidal or non-steroidal drugs, that had no effect *per se*, resulted in a marked synergistic anti-inflammatory activity.
- 5- In the mouse model of pleurisy, the participation of CD18 adhesion molecules was observed, in both phases (4 and 48 h) of the inflammatory response induced by carrageenan there was an increase of CD18 positive cells in the pleural cavity or in the lung.
- 6- Finally, in the mouse model of pleurisy was not observed a systemic inflammatory response from the fact that, no vascular permeability in the lung or spleen were observed. In addition, the cell migration composed of

mononuclears and neutrophils is dependent, in part, on CD18 expression but not on CD11a expression.

7- At last, it is proposed different experimental protocols that permit the study of a inflammation models, such as pleurisy induced by carrageenan that provide an useful tool to study and to screen drugs with anti-inflammatory profile.

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é a reação que o organismo apresenta em resposta à invasão de um agente agressor, a um estímulo com antígenos ou mesmo em consequência de uma lesão física. O desenvolvimento das reações inflamatórias, em roedores é controlado por diversos mediadores (HAANEN e VERMES, 1995). Entre eles: aminas vasoativas (histamina e serotonina); cininas; sistema complemento, como, por exemplo, C3a, C5a, C5b, C6-C9; componentes da coagulação e de fibrinólise (fibrino-peptídeos, produtos da degradação da fibrina, entre outros); metabólitos do ácido araquidônico (AA) como os produtos da via da ciclooxigenase (COX), incluindo endoperóxidos, prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) e da lipooxigenase (leucotrienos (LTs), ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico (HPETE) e hidroxieicosatetraenóico (HETE); radicais livres derivados do oxigênio; fator ativador de plaquetas (PAF-acéter); óxido nítrico (NO) e citocinas (WHATLEY et al., 1996; MCINTYRE et al., 1997; COTRAN et al., 1996).

A resposta inflamatória pode ser esquematizada em três fases distintas, cada uma delas sendo mediada, aparentemente, por mecanismos diferentes. Assim, é inicialmente evidenciada 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, a fase de regeneração tecidual ou fibrose.

Na primeira fase da reação inflamatória, o aumento do fluxo sanguíneo na área lesada, devido à dilatação e engurgitamento dos capilares e das arteríolas, bem como do recrutamento adicional de outros vasos normalmente

hipofuncionantes, é responsável pelo eritema ou rubor da área comprometida, podendo haver também elevação da temperatura local (calor) (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985; BAUMAN e GAULDIE, 1994; MCINTYRE et al., 1997). A vasodilatação deve-se à ação de mediadores químicos, nos níveis arteriolar e venular. Sabe-se que são inúmeros os mediadores liberados nesta fase. Citam-se cininas, histamina, serotonina, LTs, PAF-acéter, C5a, prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP) (GEPETTI et al., 1995; HAANEN e VERMES, 1995; CADIEUX, et al., 1999; SCHUILING et al., 1999). O exsudato formado facilita a liberação de outros mediadores, e dessa forma amplifica a resposta inflamatória.

A segunda fase da resposta inflamatória é caracterizada pela migração de leucócitos e de outras células fagocíticas para o sítio da lesão. Os fatores quimiotáticos para os leucócitos são gerados tanto na corrente sanguínea quanto no sítio da lesão. Assim, o sistema complemento e as cininas são considerados importantes fatores de origem plasmática (ABBAS et al., 1991a,b; DAVIS et al., 1994). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo. Entre os leucócitos, os neutrófilos desempenham papel importante na reação inflamatória.

O efeito secundário da resposta inflamatória e da dor é a lesão tecidual. O tecido inflamado em consequência da reação dolorosa causa a inibição

física dos movimentos, por um mecanismo de *feedback* neural (DRAY et al., 1994).

A dor que se associa à resposta inflamatória é produzida pela estimulação dos nociceptores locais por mediadores químicos, tais como, a bradicinina (BK), PGs, substância P (SP), neurocinina A (NKA), CGRP e a histamina (DRAY e BEVAN, 1993; DRAY e PERKINS, 1993; GEPETTI, 1993). Quimicamente, a transdução da dor envolve interações dos mediadores com receptores de membrana que são acoplados a canais iônicos e/ou sistemas de segundos mensageiros, resultando na mudança da excitabilidade da membrana celular. A resposta algésica induzida pelos mediadores é potencializada por produtos da via do ácido araquidônico (PGE_2 , PGI_2 , PGD_2) e por aminas simpatomiméticas, possivelmente a dopamina liberada localmente. A produção de hiperalgesia também deve ser vista como um importante mecanismo para a regeneração e o reparo tecidual (DRAY et al., 1994). Além disso, vários produtos liberados no sítio da lesão inflamatória, entre eles as citocinas, como, por exemplo, interleucinas (IL) do tipo IL-1, IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN) e lipopolissacáride (LPS), estão envolvidos na regulação da resposta febril. As citocinas, exceto a IL-8, regulam também a resposta febril com a indução da síntese de PGE_2 e $PGF2\alpha$ em áreas específicas do hipotálamo (DINARELLO, 1994).

1.1 INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA

A inflamação neurogênica pode ser definida como sendo um mecanismo de defesa endógena importante que ocorre na fase recente da resposta inflamatória,

na tentativa de limitar a lesão tecidual. Além disso, ocorre também o extravasamento de líquido e de proteínas plasmáticas dos vasos inervados por fibras nervosas sensoriais, além de vasodilatação e ativação local de células que participam da resposta imunológica. Tal conceito é baseado em evidências de que a estimulação de pequenos neurônios aferentes produz sintomas similares àqueles presentes durante a inflamação, como: vasodilatação, edema, acúmulo e agregação plaquetária e ativação de células do tipo mastócitos (LEMBECK e HOLZER, 1979; KOWALSKI e KALINER, 1988; DIMITRIADOU et al., 1992). Nessa condição, existe uma interação complexa entre as terminações nervosas e outros tipos celulares, alguns residentes, outros invasores, além de células do sistema imune.

Admite-se que as terminações de fibras nervosas sensoriais finas (fibras do tipo C e do tipo A δ) podem ser estimuladas por diversos agentes flogísticos ou por substâncias químicas geradas pelo tecido agredido. A ativação dessas terminações nervosas aferentes induz reflexo axonal e, posteriormente, liberação de neuropeptídeos como a SP, a NKA e o CGRP (GEPETTI et al., 1995). Esses neuropeptídeos, por sua vez, alteram a excitabilidade de terminais nervosos sensoriais e de fibras simpáticas pós-ganglionares. Eles também ativam células do sistema imune, alteram o fluxo sanguíneo e induzem a liberação de substâncias ativas com o extravasamento plasmático. Atualmente, muitos tipos de inflamação neurogênica intimamente relacionadas com a neurotransmissão são reconhecidas, entre elas a enxaqueca, a asma brônquica e a rinite alérgica (SHELHAMER et al., 1995). Nessas condições,

além da reação vasomotora (calor e rubor, dilatação arteriolar) no local lesado, ocorre também uma inflamação crônica (COLPAERT et al., 1983; BASBAUM e LEVINE, 1991).

1.2 FENÔMENOS CELULARES DA INFLAMAÇÃO

1.2.1 *Função dos neutrófilos e dos fagócitos mononucleares*

Os leucócitos são componentes essenciais de defesa do hospedeiro. São produzidos na medula óssea e desempenham a maioria das funções de proteção e manutenção do ambiente biológico interno do organismo.

De forma geral, os leucócitos fixam-se à superfície endotelial, onde encontram altas concentrações de citocinas quimiotáticas (chemotactic cytokines), $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, entre outras citocinas e mediadores lipídicos (BAGGIOLINI, 1998). Os produtos celulares, tanto dos linfócitos quanto dos macrófagos, difundem-se no foco inflamatório do espaço perivascular, ou mesmo das células do próprio endotélio vascular, e ativam mais leucócitos. Baixas concentrações de IL-8 (SCHROTH, 1996; CAIRNS e WALLS, 1996) produzidas pelo endotélio vascular e secretadas nas regiões subendoteliais, aumentam a adesão leucocitária e induzem sua migração (CAIRNS e WALLS, 1996). Outras substâncias quimiotáticas, como IL-2, IL-5, RANTES (regulated upon activation in normal T-cells, expressed and secreted), PAF-acéter e eotaxin-1 e 2 (específicas para eosinófilos) (SYMON et al., 1994; SCHROTH, 1996; OKADA et al., 1997; LIU et al., 1998; TEIXEIRA et al., 1999), favorecem a migração transendotelial para o espaço extravascular. A migração para o

espaço extravascular até o sítio da inflamação é guiado por concentrações aumentadas de fatores quimiotáticos, incluindo o LTB₄, o PAF-acéter, a IL-6 e algumas quimiocinas, que têm a capacidade de controlar precisamente o movimento de leucócitos, e, também, por interações entre integrinas (adesão) e proteínas teciduais extracelulares (LUSTER, 1998; RAFEUL, 1998). Ao final, já no foco inflamatório, as células (leucócitos) ampliam suas funções citotóxicas, liberando oxidantes, proteases e citocinas, como por exemplo, os fatores de crescimento.

Os leucócitos podem ser subdivididos em populações, entre as quais destacam-se os neutrófilos e os fagócitos mononucleares. Os fagócitos mononucleares têm por função destruir patógenos invasores, eliminar células e tecidos mortos da corrente sanguínea e dos locais da lesão tecidual, remodelar o tecido normal, liberar mediadores do processo inflamatório e apresentar os antígenos aos linfócitos (BOXER, 1997), enquanto os neutrófilos dedicam-se primariamente à destruição dos micróbios invasores. Os neutrófilos possuem o citoplasma repleto de grânulos, cujo conteúdo é utilizado para destruir e degradar os agentes estranhos. Os grânulos são basicamente de três tipos (CRAMER, 1992): os grânulos azurófilos contêm proteases e outras enzimas hidrolíticas, defensivas, outros peptídeos microbicidas e a mieloperoxidase, uma enzima oxidante do ânion cloreto (CL⁻), os grânulos específicos contêm, entre outros elementos, apolactoferrina, colagenase, uma enzima que promove a liberação da fração C5a do sistema complemento, suas membranas contêm receptores para substâncias quimioatraentes, proteínas da matriz celular e citocromo b558, os grânulos

terciários contêm gelatinase, e suas membranas apresentam o receptor CD11/18, essencial para a adesividade da célula no endotélio (Stossel, 1993). Os grânulos específicos sofrem desgranulação tanto nas vesículas fagocíticas quanto no ambiente externo, destruindo os microorganismos ingeridos (SMOLEN e BOXER, 1994).

Além disso, os neutrófilos promovem o *burst* respiratório, um evento metabólico que produz oxidantes microbicidas potentes com a redução parcial do oxigênio (Thelen et al., 1993). O evento é ativado pelos mesmos estímulos que provocam a desgranulação dos grânulos específicos – isto é, contato primário com partículas ingeríveis e exposição a fatores quimiotáticos.

Os grânulos azurófilos sofrem desgranulação quase exclusivamente nas vesículas fagocíticas, de modo que suas proteínas microbicidas destroem os microorganismos ingeridos. A mieloperoxidase liberada desses grânulos corresponde a 5% do peso seco dos neutrófilos. Em conjunto com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cofatores hálides oxidáveis (halo), e um pH ácido, produz ácido hipocloroso (HOCl). De forma geral, a ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) gera inúmeros radicais livres, dentre eles destacam-se: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH^-), ácido hipocloroso (HOCl) (PIZZO, 1997). Este último tem forte poder oxidante e rapidamente interage com outras moléculas, como, por exemplo, aminas, tióis, tioésteres e nucleotídeos. Daí, resulta a formação de um sistema antimicrobiano potente desenvolvido no fagolisossoma que tem capacidades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antimicoplasmal (SMOLEN e BOXER, 1994).

Estudos têm demonstrado o envolvimento da enzima mieloperoxidase, bem como a formação de anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) (SEDIVA et al, 1998a,b) em diversas patologias: nas leucemias mielóides (KONIKOVA et al., 1998), na glomerulonefrite (TAKEDA et al., 1998), na doença de Alzheimer (REYNOLDS et al., 1999), entre outras. A ausência da mieloperoxidase retarda a atividade microbicida dos neutrófilos após a fagocitose dos microorganismos. Na deficiência desta enzima, a atividade da peroxidase está ausente nos neutrófilos e monócitos, porém presente nos eosinófilos (BOXER, 1997; PIZZO, 1997). Todavia acaba ocorrendo destruição eficaz das bactérias, pois os neutrófilos com deficiência de mieloperoxidase acumulam mais peróxido de hidrogênio do que os neutrófilos normais, melhorando a atividade bactericida dos neutrófilos afetados (BOXER, 1997). A deficiência de mieloperoxidase, um distúrbio autossômico recessivo, constitui o distúrbio hereditário mais comum da função dos neutrófilos, com uma estimativa de frequência variando de 1 em cada 2000 a 1 em cada 4000 (BOXER, 1997). Do ponto de vista clínico, o problema mais freqüente consiste em aumento das infecções por *Candida sp* em alguns pacientes com diabetes mellitus concomitante (BOXER, 1997).

1.2.2 Fagócitos mononucleares

Enquanto existe apenas um tipo de neutrófilo, há muitas variedades de fagócitos mononucleares (CRAMER, 1992; GALLI, 1993). Ao contrário dos neutrófilos, os monócitos apresentam capacidade limitada de se dividir e sofrem considerável diferenciação adicional. Após circularem na corrente sanguínea, penetram nos tecidos, onde se diferenciam em macrófagos maduros, cuja

sobrevida varia de semanas a meses. Os fatores topológicos parecem influenciar sua diferenciação final e dotar cada tipo de características estruturais antigênicas e metabólicas particulares (KUIJPERS e HARLAN, 1993). Alguns dos macrófagos que aparecem no local inflamado são residentes, outros são recrutados do tecido circundante, outros são derivados da corrente sanguínea. Uma vez no local inflamado, os macrófagos podem ser estimulados por partículas opsonizadas. Os monócitos e macrófagos partilham os receptores descritos para os neutrófilos, além de expressarem diferentes outros receptores.

Os macrófagos desempenham pelo menos três funções importantes: apresentação dos antígenos, fagocitose e imunomodulação. Essas células, quando ativadas, são capazes de liberar citocinas do tipo IL-1, IL-6, TNF e $IFN\alpha/\beta$, além de citocinas envolvidas na hematopoiese, na ativação de células endoteliais e das próprias células mononucleares (KUIJPERS e HARLAN, 1993).

1.3 MOLÉCULAS DE ADESÃO

- ***Moléculas de adesão nas células endoteliais e leucócitos***

O recrutamento de leucócitos para o local da inflamação envolve uma seqüência de eventos bem coordenada e dinâmica, de que participam ativamente várias moléculas de adesão (CAMs) e citocinas quimiotáticas (BEVILACQUA, 1993).

As moléculas de adesão, dependendo da sua estrutura funcional e similaridade genética, dividem-se em 3 famílias: as integrinas, as selectinas e a superfamília das imunoglobulinas (BEVILACQUA, 1993; HELLEWELL, 1993;

PILEWSKI e ALBEDA, 1993; ALBELDA e BUCK 1990; FRENETTE e WAGNER, 1996a, b; SCHROTH, 1996).

Membros da família das selectinas medeiam a adesão reversível e o início da marginalização dos leucócitos. Estas células são capturadas pelas P-selectinas (eosinófilos) (HENRIQUES et al., 1996) e L-selectinas (neutrófilos) (SCHROTH, 1996) por intermédio de uma ligação fraca e reversível que permite o “rolamento” das células nas paredes dos vasos (SPERTINI et al., 1991; 1992). As moléculas de adesão do tipo selectinas E e P expressas nas células endoteliais, nos focos do processo inflamatório, servem como ligantes para L-selectinas específicas nos leucócitos.

A seguir, ocorre um aumento da afinidade e da adesão molecular entre a superfície dos leucócitos e as células endoteliais através da expressão de outras moléculas de adesão nos leucócitos, as β_1 integrinas, também denominadas de VLA-4 (*very late antigen*), importantes na adesão entre matriz e outra célula, e as β_2 integrinas, responsáveis pela adesão célula-célula. Estas últimas são moléculas heterodiméricas compostas por uma subunidade β denominada CD18 que se liga de forma não covalente à subunidade α (CD11a, CD11b, CD11c ou CD11d) formando diferentes complexos moleculares denominados de LFA-1 (*leukocyte function associated antigen*) ou CD11a/CD18, Mac-1 (*macrophage-1 antigen*) ou CD11b/CD18, gp150/95 ou CD11c/CD18 ou CD11d/CD18. Os complexos LFA-1 e Mac-1 são responsáveis pela adesão firme entre os leucócitos com seus receptores localizados no endotélio e as moléculas de adesão intercelular, facilitando desta forma a adesividade intercelular ao endotélio microvascular

(DUSTIN e SPRINGER, 1988; DIAMOND et al., 1990; DE FOUGEROLLES et al., 1991; NEISH et al., 1992). Incluem-se no grupo da superfamília das imunoglobulinas, moléculas de adesão intercelular ICAM-1 e 2, moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e as relacionadas às plaquetas – PeCAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) (SCHROTH, 1996). As β_2 integrinas interagem com as moléculas ICAM-1 das células endoteliais, enquanto as β_1 integrinas interagem com as moléculas VCAM-1. Esta etapa constitui o pré-requisito para a emigração dos leucócitos (WALZOG et al., 1999).

A via CD18-ICAM-1 é utilizada por todos os leucócitos (ALBELDA e BUCK, 1990; SCHROTH, 1996), ao passo que a via VLA-4-VCAM é utilizada somente por eosinófilos e mononucleares (SCHROTH, 1996). A produção de ICAM-1 é estimulada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 e o $\text{TNF}\alpha$, enquanto a VCAM-1 depende da IL-4 (SCHLEIMER et al., 1992; LUKACS et al., 1994; SCHROTH, 1996). Outras moléculas de adesão do tipo PeCAM-1 situam-se nas junções basolaterais das células endoteliais, incluindo zonas de junção intercelular, e atuam facilitando a transmigração de neutrófilos através da barreira endotelial (ELICES et al., 1990; WALSH et al., 1991; RAINGER et al., 1999).

Embora vários estudos *in vitro* revelem o papel das moléculas de adesão, sua real importância tem sido demonstrada em doenças raras, como, por exemplo, na síndrome da deficiência de adesão dos leucócitos (SDL), causada pelo defeito da subunidade beta das integrinas, ou diminuição do ligante para as selectinas (sialil lewis X) (ETZIONI, 1996). Além disso, estudos experimentais *in vivo* e

estudos em humanos revelam que as moléculas de adesão estão envolvidas em várias outras patologias: na rejeição de enxerto, no choque séptico, na aterosclerose, em reações de hipersensibilidade retardada, nas doenças renais (ETZIONI, 1996; COTRAN e MAYADAS-NORTON, 1998), nas doenças auto-imunes (MCMURRAY, 1996), na hepatite alcoólica, na hepatite e na cirrose, na hepatite viral (JAESCHKE, 1997), na esclerose múltipla, na encefalomielite alérgica (MIZOBUCHI e IWASAKI., 1994), em doenças alérgicas (SMITH, et al., 1993), entre outras. O entendimento do mecanismo de comunicação intercelular entre o endotélio e as células define novos alvos para a intervenção terapêutica e expande o espectro de diagnóstico das doenças envolvidas. Além disso, o desenvolvimento de antagonistas de moléculas de adesão, como, por exemplo, antagonistas de integrinas, representa um papel importante no campo das doenças auto-imunes, bem como das doenças inflamatórias (HELLEWEL, 1993; MCGREGOR, et al., 1998).

1.4 MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO

1.4.1 EICOSANÓIDES

O ácido araquidônico, derivado de fontes dietéticas, é transportado no plasma, tanto na forma esterificada, quanto na forma não-esterificada, ligado, sobretudo, a lipoproteínas e albumina, respectivamente. A importância relativa das duas formas para o suprimento celular está pouco elucidada. O ácido graxo é compartimentalizado no domínio fosfolipídico das membranas celulares. A localização parece ser relevante em termos de disponibilidade para sua liberação. Acredita-se que a fosfolipase A_2 (PL) A_2 seja

extremamente importante para o processo. A fosforilação pelas proteínas quinases e proteína C reativa, ativadas por mitógenos, permite sua translocação para a membrana celular, um processo dependente de cálcio. Outras fosfolipases podem também participar na liberação do araquidonato. A oxigenação subsequente pela ciclooxigenase ou lipooxigenase dá origem a compostos biologicamente ativos.

Todas as células são capazes de liberar AA, no entanto os produtos enzimáticos predominantes assim formados são altamente específicos ao nível celular. Como derivam de um ácido graxo eicosanóico, esses compostos - tromboxano A₂, prostaglandinas, epoxigenases, leucotrienos e lipoxina-são coletivamente denominados de eicosanóides.

1.4.1.1 A VIA DA CICLOOXIGENASE

A biotransformação do AA em tromboxano A₂ e em PGs é catalisada pela enzima COX de ácidos graxos. Esta enzima foi purificada em 1976 e clonada em 1988 e é a principal enzima envolvida na síntese de PGs. Duas isoformas da COX têm sido identificadas com base na estrutura molecular e em sua localização intracelular (VANE et al., 1998). As PGs, de forma geral, estão envolvidas tanto em condições fisiológicas como patológicas. A COX-1, por exemplo, é constitutiva e medeia importantes funções homeostáticas, como a manutenção da integridade do epitélio da mucosa gastrointestinal, a função plaquetária e a regulação do fluxo sanguíneo renal normal (CROFFORD, 1997). A COX-2, na forma constitutiva, é encontrada no cérebro e na medula espinhal, onde está envolvida na neurotransmissão,

particularmente, da dor e da febre (NEEDLEMAN e ISAKSON, 1997). A forma induzida dessa enzima é expressa em lesões de caráter inflamatório (VANE et al., 1998). Além disso, o emprego da técnica de Northern blot e de reações em cadeia pela polimerase revela que a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de ambas as enzimas COX-1 e 2 estão presentes em tecidos humanos, como por exemplo: no pulmão, no útero, no pâncreas, nos rins, no fígado, no timo, na próstata, nas glândulas mamárias, no estômago e no intestino (O'NEIL e FORD-HUTCHINSON, 1993). Dentre os principais agentes indutores da COX-2, destacam-se, entre outros, as citocinas, as toxinas como o LPS, os promotores tumorais, os fatores de crescimento e as gonadotropinas. Em conseqüência, acredita-se que a COX-2 tenha importância predominante não só na produção de PGs, em processos de inflamação e febre, mas também, no câncer de cólon humano (CROFFORD, 1997; DUBOIS et al., 1998).

• **POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DA COX-2**

Os eicosanóides são mediadores que participam tanto de processos fisiológicos como patológicos. O conhecimento da função específica dos metabólitos da via do AA e o desenvolvimento de inibidores enzimáticos mais potentes e específicos serão extremamente importantes para o estudo de novas drogas e sua possível aplicação terapêutica.

As principais doenças em que inibidores da COX-2 apresentam eficácia terapêutica são: osteoartrite, artrite reumatóide, febre, dor aguda e crônica (principalmente dor de origem pós-operatória), doenças neurodegenerativas

(Alzheimer) e câncer de colo (VANE et al., 1998). Tendo em vista que a COX-2 está envolvida principalmente em processos inflamatórios, estudos pré-clínicos têm mostrado que a inibição seletiva da COX-2 é suficiente para produzir efeito antiinflamatório, antipirético e analgésico (VANE et al., 1998).

Estudos epidemiológicos demonstram que o uso de antiinflamatórios não esteroidais reduz de 40 a 50% o índice de mortalidade de pacientes com câncer colorretal (THUN et al., 1991; GIOVANNUCCI et al., 1994). Apesar dos efeitos colaterais, como, por exemplo, desconforto epigástrico e sangramento, entre outros, o uso de antiinflamatórios não esteroidais apresenta considerável efeito protetor e redução nas neoplasias colorretais (GIARDIELLO et al., 1993; GIOVANNUCCI et al., 1994). Outro efeito importante observado em pacientes com polipose adenomatosa familiar, é a redução que tais medicamentos promovem tanto no tamanho quanto do número de adenomas (WADDELL et al., 1989). Em modelos animais de carcinogênese da região colorretal, o tratamento prévio com inibidores da COX-2 promove uma redução do número de lesões malignas (KULKARNI et al., 1992). O mecanismo pelo qual os antiinflamatórios não-esteroidais reduzem o risco de neoplasias malignas, ainda não está bem esclarecido. Uma possível explicação é que essas drogas alteram o metabolismo do AA, reduzindo a produção de eicosanóides envolvidos na proliferação de vários tipos celulares (LEVI et al., 1990; CYBULSKY et al., 1992). Além disso, estudos têm confirmado o envolvimento da COX e das PGs em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Relatos publicados em 1998 confirmam estudos anteriores que demonstram uma correlação inversa

entre a severidade ou incidência da doença de Alzheimer e a ingestão de antiinflamatórios não-esteroidais, como o ibuprofeno (VANE E BOTTING, 1998a) Os mesmos estudos demonstram também que há um componente inflamatório nas lesões nervosas da doença de Alzheimer (VANE et al., 1998, VANE e BOTTING, 1998b).

Foram observadas diversas complicações gastrointestinais causadas pelo uso prolongado de antiinflamatórios não-esteroidais, incluindo a morte de pacientes. Atualmente já existem inibidores mais seletivos da COX-2, como, por exemplo, a nabumetona e o nimesulide, utilizados na clínica em pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite, reumatismos não articulares, que têm revelado um perfil de eficácia analgésica e antiinflamatória semelhante a outros antiinflamatórios não-esteroidais (BENSEN e ZIZZO, 1998; COACCIOLI et al., 1998).

1.4.1.2 VIA DA LIPOOXIGENASE

Os leucotrienos, produzidos pela via das 5-lipooxigenases a partir do metabolismo do AA, são potentes mediadores envolvidos nas reações inflamatórias. Estudos mostram que tais mediadores são responsáveis pela formação de edema e pápula, quando administrados na pele humana (CAMP et al., 1983); pelo aumento da permeabilidade vascular na artéria mesentérica de rato (LENG et al., 1988); pelo extravasamento plasmático em cobaia (DRAZEN et al., 1980) e em rato (UENO et al., 1981). Além disso, demonstrou-se que os LTs, principalmente os que possuem grupamento cisteínicos (LTC₄, LTD₄, LTE₄), estão envolvidos nas doenças inflamatórias

alérgicas, como a asma brônquica (O'BYRNE, 1996) e a rinite alérgica (CRETICOS et al., 1984), promovendo broncoconstrição, edema, hipersecreção de muco, além da infiltração eosinofílica das vias aéreas. Outros dados da literatura mostram o envolvimento dos LTs nas reações alérgicas cutâneas (DORSCH et al., 1985; BISGAAR et al., 1985; TALBOT et al., 1985) e nas reações de hipersensibilidade tipo 1, demonstrada no modelo da peritonite alérgica, em camundongos (ZUANY-AMORIM et al., 1993).

Tendo em vista a participação desses mediadores na resposta inflamatória, principalmente no que diz respeito a doenças das vias aéreas, antagonistas foram desenvolvidos para bloquear a síntese ou as interações com os receptores dos leucotrienos. Os agentes de uso clínico, em vários países, incluem: zileuton (inibidor de síntese), pranlucast, montelucast e zafirlucast (antagonistas de receptores de leucotrienos). O efeito broncodilatador é modesto, lento e inferior ao obtido com os beta-agonistas, embora possa ser aditivo a estes. O efeito antiinflamatório não foi demonstrado diretamente, mas pode ser inferido pela redução dos eosinófilos circulantes e presentes no escarro, pela redução do número de crises e pelo aumento gradual da função pulmonar durante o tratamento. Existe também diminuição da hiper-reatividade brônquica com o uso prolongado. Estudos multicêntricos mostram que antagonistas de LTs, produzem, em geral, efeito semelhante ao obtido com a teofilina e com corticóides inalados em doses baixas. Sua indicação principal, portanto, deve ser considerada para portadores de asma moderada (INTERNATIONAL ASTHMA MANAGEMENT PROJECT, 1992; PEREIRA e SOLÉ, 1998).

1.4.2 CININAS

As cininas, incluindo a BK e a lisil-BK (Lys-BK: calidina), são oligopeptídeos formados endogenamente, conhecidos por exercerem diversos efeitos biológicos em modelos animais (ROCHA E SILVA, 1978) e em humanos (HALL, 1992). São produzidas em vários órgãos e podem ser detectadas em secreções (urina, saliva e suor, por exemplo), no fluido intersticial e no sangue.

As cininas são formadas a partir dos cininogênios, α_2 -globulinas de alto (626 aminoácidos (aa), 88 aa 120 KD) e de baixo (409 aa, 50 a 68 KD) peso molecular, ambas expressas a partir de um único gene (BHOOLA et al., 1992; HALL, 1992; MARGOLIUS, 1995; HALL, 1997; BARNES et al., 1998).

Em humanos, a BK e a Lys-BK são as cininas que possuem papel fisiológico e patológico relevantes, incluindo contração da musculatura lisa, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, indução da dor (DRAY e PERKINS, 1993; DRAY e BEVAN, 1993). Dois subtipos de receptores foram clonados e até o momento estudados extensivamente. A classificação desses receptores fez-se principalmente com base farmacológica. São eles: receptores B₁ e B₂ (REGOLI e BARABÉ, 1980; BURCH et al., 1993; HALL, 1997). O receptor B₂ possui afinidade pelas cininas: BK e calidina; já o receptor B₁ tem alta afinidade pelos metabólitos das cininas (des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina (MARCEAU, 1995). Um terceiro, denominado receptor B₃ ou subtipo do receptor B₂, tem sido sugerido por alguns autores, embora não foi ainda confirmado em estudos de biologia molecular (HALL, 1997).

O receptor B₂ da BK é expresso de forma constitutiva em diversos tecidos e células (BATHON e PROUD, 1991) e exerce diversas ações, entre elas, a produção e a liberação de diversas substâncias químicas endógenas, como prostanóides, citocinas (IL-1 e TNF de macrófagos), além do NO liberado das células endoteliais vasculares (DRAY e BEVAN, 1993).

Evidências vêm mostrando a participação da BK na resposta inflamatória através dos receptores B₁ e B₂, da interação com outros mediadores ou da amplificação do processo inflamatório. Entre os mediadores liberados pela BK, podemos citar: os prostanóides, as taquicininas, o CGRP, a histamina, o NO, entre outros (BURCH e AXELROD, 1987; BURCH e DEHAAS, 1990; BURCH e KYLE, 1992, BURCH et al., 1990; BATHON e PROUD, 1991; HALL, 1992; BERTRAND et al., 1993; FOX et al., 1993; HALL, 1997). Os efeitos pró-inflamatórios das cininas incluem: a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (MARCEAU et al., 1983; SHARMA et al., 1983). Tais efeitos são confirmados com a aplicação local da BK na pele, em humanos (GREAVES e SHUSTER, 1967), na pata de rato (JEZDINSKY e HALEK, 1974) ou no joelho de cão (MELMON et al., 1967). Além disso, evidências mostram a participação da BK nas reações inflamatórias, constando-se a ativação do sistema cininas-caliceínas em diversas condições patológicas, incluindo lesão térmica e química (CLARK, 1979), reações alérgicas (PROUD, 1998), artrite reumatóide, psoríase e gota (HAMBERG et al., 1978; SHARMA et al., 1983), asma (PONGRACIC et al., 1991; BARNES, 1992a, b; PROUD, 1998), doenças inflamatórias do cólon (ZEITLIN e SMITH, 1973), pneumonia aguda e bronquite crônica (ZHANG et al., 1997), pancreatite (YOTSUMOTO et al., 1993), reações inflamatórias do Sistema Nervoso Central

(SNC) seguida de lesão tecidual: meningite, encefalomielite, isquemia cerebral, enxaqueca (RAIDOO e BHOOLA, 1998).

Já o receptor B₁ da BK não está presente em tecidos normais e é expresso em pequeno número de células, como, por exemplo, em fibroblastos de pulmão embrionário, células da musculatura lisa vascular e células endoteliais após injúria tecidual e nos processos inflamatórios (GOLDSTEIN e WALL, 1984; SMITH et al., 1995). Recentes estudos em modelos de hiperalgesia, utilizando animais *knockout* mostram que os receptores B₁ da BK estão envolvidos nas doenças inflamatórias crônicas (DRAY e PERKINS, 1993; PESQUERO e BADER, 1998). A expressão desse receptor pode ser induzida por lesão tecidual, ou por exposição *in vivo* ou *in vitro* a mediadores pró-inflamatórios, como, por exemplo, LPS (MARCEAU, 1995), citocinas (IL-1 β , IL-2 e IL-8) (DEBLOIS et al., 1988; 1989). Além disso, o receptor B₁ da BK tem sido implicado, principalmente, nas doenças inflamatórias crônicas, com ou sem reabsorção óssea, incluindo, periodontite, artrite reumatóide e osteomielite (LJUNGGREN e LERNER, 1990), cistite crônica (MARCEAU et al., 1980) e hiperalgesia (CORRÊA e CALIXTO, 1993; PERKINS et al., 1993; DAVIS et al., 1994).

Antagonistas seletivos do receptor B₂ da BK têm sido desenvolvidos para o tratamento das doenças de caráter inflamatório, principalmente as doenças das vias aéreas, como a asma brônquica (BURCH et al., 1990; BARNES, 1992a,b; BURCH e KYLE, 1992). Alguns desses agentes mostraram eficiência no controle dos sintomas, no entanto não está claro se os efeitos são antiinflamatórios. O NPC 567 (antagonista seletivo do receptor B₂ da BK) demonstrou ser incapaz de inibir o

efeito da BK nas secreções nasais, mesmo quando administrado ao mesmo tempo que a BK (PONGRACIC et al., 1991), isto porque a droga é rapidamente metabolizada. Já o Icatibant, também denominado de HOE 140, outro antagonista seletivo para o receptor B₂ da BK, de ação mais potente e duradoura, tendo em vista ser parcialmente resistente à degradação enzimática (HOCK et al., 1991; LEMBECK et al., 1991, 1992; WIRTH et al., 1991), inibe substancialmente a broncoconstrição e o extravasamento plasmático induzidos pela BK *in vivo* (WIRTH et al., 1993; SAKAMOTO et al., 1992), bem como os efeitos induzidos pela BK nas fibras nervosas sensoriais das vias aéreas (MIURA et al., 1992). Estudos clínicos com o icatibant são limitados, no entanto existem evidências mostrando que a aplicação nasal deste antagonista diminuiu a secreção nasal induzida por alérgenos em pacientes com rinite alérgica (AUSTIN et al., 1994). Outros estudos mostram que o icatibant administrado através de nebulizações promove uma melhora das funções nas vias aéreas de pacientes asmáticos, sem que, entretanto, sejam alterados os sintomas da doença (AKBARY et al., 1996). Antagonistas não peptídicos também têm sido desenvolvidos, como, por exemplo, o WIN 64338, que demonstrou bloquear a broncoconstrição *in vitro* induzida pela BK (SCHERRER et al., 1995). Além disso, outros antagonistas não peptídicos como o NPC 18884 e o FR 167344, vêm sendo desenvolvidos, no entanto, este último mostrou-se menos potente que os anteriormente mencionados (INAMURA et al., 1997; SALEH et al., 1998).

1.4.3 ÓXIDO NÍTRICO

A vasodilatação que ocorre nas fases iniciais do processo inflamatório, induzida por diferentes agentes, incluindo BK, histamina, SP, serotonina e trombina, é dependente da liberação do fator relaxante derivado do endotélio, o NO (PALMER et al., 1987). O NO endógeno possui um papel importante na regulação de diversas atividades fisiológicas, incluindo o relaxamento vascular, a inibição da agregação plaquetária, a neurotransmissão, as atividades antimicrobiana e anti-tumoral dos macrófagos, entre outras (PALMER et al., 1987; MONCADA et al., 1991; PALACIOS et al., 1989; IANARO et al., 1994; WARD et al., 1995a; SALVEMINI et al., 1995).

O NO é um gás derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). O NO gerado difunde-se pelas células e ativa a guanilato ciclase solúvel, resultando na formação do monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina (GMPc). Na musculatura lisa, o GMPc causa relaxamento (WARD et al., 1995a). Outros efeitos do NO, entretanto, são decorrentes da ação citotóxica de alguns de seus metabólitos, como, por exemplo, o peroxinitrito e os nitrosotíóis (BARNES, 1996a,b).

São descritas 3 isoformas da NOS (NATHAN e XIE, 1994), das quais 2 são constitutivas (NOc) e estão localizadas no tecido nervoso central (óxido nítrico sintase neuronal: NOSn ou NOS I), e a outra, nas células endoteliais (óxido nítrico sintase endotelial: NOSe ou NOS III) (FÖRSTEMANN et al., 1993; AUBRY et al., 1997). Já, a óxido nítrico sintase induzida (NOSi ou NOS II) não é, em geral, expressa em condições fisiológicas. Diversos agentes, como citocinas inflamatórias, oxidantes e endotoxinas de bactérias Gram-negativas, induzem a

sua expressão em diferentes tipos celulares como os macrófagos (MARLETTA et al., 1988; STUEHR et al., 1989; MORRIS e BILLIAR, 1994), os neutrófilos (MCCALL et al., 1991; KOLLS et al., 1994; WANIKIAT et al., 1997; EISERICH et al., 1998), os mononucleares (SALVEMINI et al., 1989), os eosinófilos e as células da musculatura lisa vascular (BUSSE e MÜLSCH, 1990; GROSS e LEVI, 1992; GUO et al., 1995). Essa enzima é pouco dependente de cálcio (Ca^{+2}). A expressão da NOS_i resulta na geração de quantidades muito maiores de NO, em comparação com aquelas produzidas pela NO_c.

A NOS_i está envolvida na fisiopatologia das doenças inflamatórias, como a sepsis (KILBOURN et al., 1990; PETROS et al., 1991; AVONTUUR et al., 1998), a artrite reumatóide (FARRELL et al., 1992; STEFANOVIC-RACIC et al., 1994; HILLIQUIN et al., 1997; MYIASAKA e HIRATA, 1997; CLAIR, 1998; JANG e MURELL, 1998), a glomerulonefrite (JANSEN et al., 1994; WEINBERG et al., 1994), o diabetes (CORBETT et al., 1993; KLEEMANN et al., 1993), a rejeição de enxertos (GARSIDE et al., 1992), as doenças neurológicas (KOPROWSKY et al., 1993), as doenças das vias aéreas (GASTON et al., 1994; BARNES et al., 1998; BERNAREGGI et al., 1997), e na defesa contra infecção, entre outras funções.

Entre as doenças em que a participação do NO tem sido muito estudada incluem-se a asma brônquica e o choque séptico (BARNES e BELVISI, 1993; BARNES, 1995; BARNES, 1996a,b; BERNAREGGI et al., 1997; WOLKOW, 1998). Estudos imunohistológicos identificaram a presença das 3 isoformas da NOS, nas vias aéreas de humanos (KOBZIK et al., 1993; WARD et al., 1995b; GIAID et al., 1998). A NOS_e está localizada nas células endoteliais da circulação pulmonar e no epitélio. A NOS_n foi caracterizada tanto nos nervos colinérgicos como em

células epiteliais das vias aéreas (FISCHER et al., 1993; ASANO et al., 1994). Estudos em tecidos de pacientes asmáticos, utilizando técnicas imunohistoquímicas identificaram a NOSi nas células epiteliais, nos macrófagos e nos eosinófilos das vias aéreas (GIAID et al., 1998; HAMID et al., 1993; DEL POZO et al., 1997). Tais resultados foram validados em cultura de células epiteliais das vias aéreas humanas. Nas mesmas condições experimentais, citocinas pró-inflamatórias aumentam a liberação de NO, bem como a imunorreatividade para a NOSi e o nível do RNAm para NOSn (ROBBINS et al., 1994; ASANO et al., 1994; GUO et al., 1995).

O choque séptico é a principal causa-morte de pacientes internados na unidade de terapia intensiva. A síndrome clínica do choque séptico é caracterizada por intensa hipotensão e, conseqüentemente, pela falência de múltiplos órgãos e morte. Entre os mediadores envolvidos no choque séptico destacam-se o NO e seus metabólitos (peroxinitrito), responsáveis pela hipotensão severa, pela apoptose celular, pela acidose láctica e pela falência dos órgãos (WOLKOW, 1998).

Trabalhos recentes mostraram que a expressão da NOSi está associada à ativação prévia do receptor do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (NF-κB), envolvido na transcrição de muitos genes das respostas imunes e inflamatórias (BARNES e KARIN, 1997). A ativação do receptor NF-κB constitui uma etapa essencial para a transcrição do gene da NOSi e pode ser ativado por citocinas pró-inflamatórias (XIE et al., 1994).

1.4.4 CITOCINAS

O sistema imunológico, bem como as células que participam da defesa do organismo possuem várias estratégias para destruir microorganismos ou qualquer antígeno invasor. Dentre os principais mediadores, destacam-se as citocinas, que estão envolvidas no crescimento e diferenciação celular, na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual, além de outras funções (HENDERSON et al., 1996). As citocinas são glicoproteínas liberadas localmente ou em nível sistêmico e consideradas mediadores homeostáticos, razão pelo qual participam do sistema de defesa do organismo (HENDERSON et al., 1996).

Pelo menos 200 citocinas já foram identificadas nos últimos anos e muitas delas possuem seus receptores clonados. De forma geral, incluem-se entre elas as interleucinas, o interferon gamma (IFN), o fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), o fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF α e TNF β) e as quimiocinas (GALANAUD, 1997). Dentre as principais células que produzem citocinas, destacam-se os linfócitos T auxiliares (CD4⁺). De acordo com o tipo de citocinas que liberam, os linfócitos T ainda são subdivididos em populações denominadas de TH1 e TH2 (MOSMANN et al., 1986). As células TH1 secretam principalmente IFN γ e TNF, enquanto clones de células TH2 produzem principalmente IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (HOWARD et al., 1993a). As células do tipo TH1 estão envolvidas no processo inflamatório, enquanto as do tipo TH2 regulam principalmente a produção de imunoglobulinas E (IgE), que são importantes na patogênese das doenças alérgicas (ROMAGNANI, 1994; ABBAS et al., 1991a; KAY, 1996). Além disso, o balanço entre estes dois clones celulares,

TH1 e TH2, parece ser importante na geração ou correção das disfunções imunológicas. A Tabela 1 mostra a liberação de citocinas segundo clones de células T (CD4⁺).

Tabela 1 – Liberação de citocinas segundo clones de células T (CD4⁺) adaptado de HOWARD, et al., 1993b.

Citocinas	TH1	TH2
IL-2	+	-
IFN γ	++	-
TNF β	++	-
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-9	-	++
IL-10	-	++
TNF α	++	+
GM-CSF	++	+
IL-3	++	++

As interleucinas, bem como o TNF α , estão em geral envolvidas na indução e na manutenção do processo inflamatório (DINARELLO, 1994). Outras citocinas, como a IL-10, o fator de crescimento tumoral (TGF β) e o antagonista do receptor da IL-1 (IL1-RA), possuem papel modulador do processo inflamatório (HENDERSON e POOLE, 1994), sendo, inclusive, descritos efeitos antiinflamatórios em alguns modelos (ZUANY-AMORIM et al., 1995; 1997; VAN DER POLL et al., 1995; KUNZ et al., 1997). Assim, de acordo com suas funções biológicas, contribuem tanto para a perpetuação como para a resolução do processo inflamatório (GALANAUD, 1997). A Tabela 2 mostra a classificação das citocinas tomando-se por base sua função biológica.

Tabela 2- Classificação das citocinas de acordo com a função biológica adaptada de GALANAUD, 1997.

Resposta Imunológica	Inflamação e Reparo Tecidual	Atividade Anti-viral	Hematopoiese	Quimiotaxia
IL-1 (α e β)	IL-1 (α e β)	IFNs tipo I	GM-CSF	Quimiocinas
IL-2	TNF (α e β)	IFNs- α	M-CSF	IL-8
IL-4		IFN- β	G-CSF	IP-10
IL-5		IFN- ω		GRO
IL-6	IL-6	IFNs- τ	IL-3	PF-4
IL-9	IL-11		IL-5	SDF-1
IL-10	LIF	IFN tipo II	IL-7	Quimiocinas- β
IL-11	OSM	IFN- γ		MCP-1, -2, -3
IL-12	CNTF			MIP-1 α e β
IL-13		IL-16		RANTES
IL-14	IL-1RA			Eotaxina
IL-15	IL-10			
IFN- δ	TGF- β			
TNF (α e β)	PDGF			
	FGF _a			
	FGF _b			

As principais citocinas do sistema de defesa são: IFN: interferon; TNF: fator de necrose tumoral; IL1-RA: antagonista natural do receptor da IL-1; LIF: fator inibitório leucêmico; OSM: oncostatina M; CNTF: fator neurotrófico ciliar; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; FGF_a: fator de crescimento ácido do fibroblasto; FGF_b: fator de crescimento básico do fibroblasto; TGF: fator de crescimento tumoral; GM-CSF: fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos; M-CSF: fator estimulante de colônia de macrófago; G-CSF: fator estimulante de colônia de granulócitos; IP: proteína induzida pelo interferon; GRO: fator relacionado ao crescimento; PF: fator plaquetário; SDF: fator derivado do estroma; MCP: proteína quimiotática de monócitos; MIP: proteína inflamatória de

macrófago; RANTES: proteínas reguladas, expressadas e secretadas na ativação normal de células T.

1.4.4.1 RECEPTORES DAS CITOCINAS

Os receptores das citocinas são complexos multiproteicos, constituídos por 2 ou 3 cadeias, localizados na membrana celular. A cadeia alfa (α) serve para ligação entre a citocina e seu receptor, sendo responsável pela afinidade e especificidade das duas moléculas (DUSANTER-FOURT et al., 1994; KISHIMOTO et al., 1994), enquanto a cadeia β (eventualmente uma cadeia γ) promove o sinal de transdução.

Os receptores de muitas citocinas têm sido clonados e com base na homologia em algumas regiões, têm sido agrupados em superfamílias (KISHIMOTO et al., 1994).

Os receptores da superfamília das citocinas apresentam afinidade e especificidade para a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 e para o GM-CSF. Cada receptor é um heterodímero, e possui uma região extracelular contendo domínios ligados à fibronectina do tipo III e outro semelhante à estrutura das imunoglobulinas (BARNES et al., 1998).

Nas células, a IL-1 interage com, pelo menos, dois tipos de receptores (I e II). O receptor I é encontrado principalmente em linfócitos T e em fibroblastos, enquanto o II é expresso em linfócitos B, monócitos e neutrófilos. No entanto, trabalhos têm demonstrado a presença do receptor tipo I nos neutrófilos e nas células endoteliais (BRANDOLINI et al., 1995; MATSUKAWA

et al., 1995). Tem sido também demonstrado que a IL-1 age preferencialmente via receptor tipo I e que o receptor do tipo II ou do antagonista do IL1-RA são inibitórios (BROOKS e MIZEL, 1994). Outros estudos demonstram que tanto o TNF α como a IL-1 β são capazes de liberar IL-6, promovendo a regulação e a ativação da resposta inflamatória (SIRONI et al., 1989).

Outro grupo são os receptores da superfamília das imunoglobulinas, que apresentam na região extracelular um domínio para as imunoglobulinas. Esses receptores incluem as citocinas do tipo IL-1, IL-6, PDGF, e GM-CSF.

Os receptores ligados à proteínas quinases possuem domínio extracelular, transmembrânico, intracelular e domínio catalítico. Neste último há um sítio catalítico relacionado com a ativação da tirosina quinase. Tais receptores incluem os receptores para fatores de crescimento, como: PDGF FGFa, e FGFb (BARNES et al., 1998).

Os receptores da superfamília do interferon possuem um único domínio transmembrânico (receptores para IFN γ e IL-10) ou duas regiões homólogas extracelulares (receptores para IFN α/β), onde ocorre fosforilação proteica e ativação de proteínas tirosinas-quinases. (BARNES et al., 1998).

Os receptores para os fatores de crescimento do nervo são caracterizados por apresentarem 3 ou 4 resíduos de cisteína situados na região extracelular. O mecanismo de transdução ainda não foi elucidado (BARNES et al., 1998).

Os receptores ligados a proteínas G incluem os receptores das quimiocinas, possuem 3 domínios extracelulares, 7 domínios transmembrânicos e 3 domínios intracelulares, além de uma cabeça N-terminal extracelular e 1 cauda C-terminal

intracelular. Quando ativados, esses receptores induzem a hidrólise do fosfato de inositol e ativam proteínas quinases e canais iônicos (BARNES et al., 1998).

1.4.4.2 CITOCINAS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Diversos são os estímulos para a liberação das citocinas, e incluem infecção bacteriana, viroses, parasitoses, micoses, tumores, traumas (intervenção cirúrgica), estímulos físicos (queimaduras, irradiações), necrose tecidual (infarto), respostas imunológicas (doença auto-imune, rejeição de enxerto), entre outros. As citocinas parecem ampliar e perpetuar a resposta inflamatória e podem ser importantes na severidade da doença e na resistência à terapia antiinflamatória em algumas doenças como a asma (BARNES, 1992a; KRISHNASWAMY et al., 1993; PARK et al., 1994; BARNES, 1996a).

As citocinas promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios do tipo LTs, PGs, PAF-acéter, proteases e radicais livres (ERTEL et al., 1991; BOUÉ, 1997; KIM et al., 1998), bem como induzem a expressão de moléculas de adesão em fibroblastos e nas células endoteliais. A produção hepática de proteínas de fase aguda durante a resposta inflamatória é estimulada com a liberação da IL-1 e da IL-6 (DINARELLO et al., 1991; GALNAUD, 1997).

Várias citocinas têm sido alvo de estudos clínicos, não só para o diagnóstico de diversas patologias, mas também no tratamento de doenças, principalmente de caráter inflamatório, como, por exemplo, a asma brônquica, a psoríase, as doenças alérgicas, além do câncer e de doenças auto-imunes (KRISHNASWAMY et al., 1993; YAMAGUCHI et al., 1995; GALANAUD, 1997). A Tabela 3 resume o

possível potencial clínico de algumas citocinas humanas, tanto no diagnóstico como no tratamento de diversas patologias.

Tabela 3- O possível potencial clínico de citocinas humanas no diagnóstico e no tratamento de diversas patologias adaptado de MAINI et al., 1993; GALANAUD, 1997:

CITOCINAS	POSSÍVEL USO CLÍNICO
Antagonista do receptor da IL-1 IL-10	Antiinflamatório na artrite reumática Câncer Linfomas não Hodgkin Mieloma múltiplo Melanoma Ovariano
IL-11	Câncer de mama
IL-12	Câncer
IL-13	Antiinflamatório
IL-14	SIDA
MCP-1	Linfomas Aterosclerose Fibrose pulmonar Artrite reumatóide Psoríase Asma Gengivite crônica Câncer

Dentre as citocinas conhecidas pelos seus efeitos pró-inflamatórios destacam-se a IL-1 β , o TNF α e a IL-8.

Estudos de biologia molecular revelam que a interleucina-1 (IL-1) é uma citocina inflamatória composta por duas isoformas (IL-1 α e IL-1 β), que apresentam homologia entre os aminoácidos de aproximadamente 40% e aparentemente se ligam ao mesmo receptor (LOMEDICO et al., 1984). Esta citocina é liberada por diferentes tipos celulares (SUTTLES et al., 1990 a, b),

principalmente macrófagos, em resposta à infecção, toxinas microbianas, agentes inflamatórios, produtos derivados dos linfócitos, componentes do sistema complemento (DINARELLO, 1988a, b; DINARELLO et al., 1989). Além disso, a IL-1 medeia diferentes efeitos inflamatórios (DINARELLO, 1988a, b) como recrutamento de leucócitos, principalmente de polimorfonucleares, durante o processo inflamatório (KAMPSCHMIDT e PULLIAM, 1978; BECK et al., 1986), induz a liberação de pirógenos endógenos (DINARELLO, 1984a, b), promove a liberação de outros mediadores inflamatórios (SUBRAMANIAN e BRAY, 1987; BUSSOLINO et al., 1988), diminui os linfócitos circulantes, induz febre (DINARELLO, 1984a,b; ULICH et al., 1987, 1989), além de estimular várias células que liberam outras citocinas como a IL-6 (SIRONI et al., 1989) e a IL-8 (MATSUSHIMA et al., 1988). Em resposta à carragenina, parece que células locais liberam pequenas quantidades de IL-1 β capazes de induzir a liberação de citocinas secundárias, que por sua vez, liberam outros mediadores, como por exemplo, metabólitos do AA, que agem sinergisticamente com outras citocinas, principalmente o TNF α , (DOZEN et al., 1989) promovendo também a quimiotaxia de mais leucócitos para a cavidade pleural, amplificando assim a resposta inflamatória. Outros estudos demonstram que as mesmas células que participam do processo inflamatório podem liberar inibidores da IL-1 promovendo regulação do processo inflamatório (TIKU et al., 1986; UTSUNOMIYA et al., 1991; HANNUM et al., 1990). Estes autores demonstraram ainda que na pleurisia induzida pela

carragenina, em ratos ocorre aumento da IL-1 β 2 a 4 h depois, havendo diminuição significativa 5 h após a administração do agente flogístico.

O TNF α , outra citocina conhecida por seus efeitos pró-inflamatórios, é o principal mediador da resposta sistêmica à sepsis ou lesão tecidual (MARKS et al., 1990; SUTER et al., 1992; VASSALLI, 1992). Esta citocina participa da resposta imune e inflamatória em resposta a invasão microbiana, no pulmão (VASSALI, 1992; BEUTLER e GRAU, 1993; STRIETER e KUNKEL, 1994; SMITH et al., 1998; SKERRETT et al., 1999). Além disso, o TNF α também está envolvido na patogênese da artrite reumatóide (KOLLIAS, 1993), na síndrome da angústia respiratória (SARA) (SUTER et al., 1992; SHANLEY et al., 1995), entre outras. O TNF α é liberado por diferentes tipos celulares, sendo os macrófagos e linfócitos T, sua principal fonte de liberação (MOHLER et al., 1993). Esta citocina estimula no endotélio a expressão de moléculas de adesão do tipo E-selectinas e integrinas, promove a liberação de agentes quimiotáticos e aumenta a atividade fagocítica de macrófagos, no pulmão (SMITH et al., 1998). O papel desta citocina, no pulmão não está completamente esclarecido. Estudos realizados por DENIS et al., (1991a,b) têm demonstrado que a liberação do TNF α decorrente à infecção pulmonar por *Micropolyspora faeni* agrava o quadro da pneumonia, em camundongos. Além disso, esta citocina aumenta o influxo de polimorfonucleares em modelos de inflamação pulmonar, em camundongos (BURET et al., 1994; GOSSELIN et al., 1995; KOLLS et al., 1994; LAICHALK et al., 1996; SONODA et al., 1997).

A IL-8, também considerada uma citocina pró-inflamatória, é liberada pelos monócitos/macrófagos (YOSHIMURA et al., 1987), pelos eosinófilos (YOUSEFI et al., 1995), pelas células epiteliais das vias aéreas (NAKAMURA et al., 1991; KWON et al., 1994), pelas células endoteliais (STRITER et al., 1989), pelos polimorfonucleares (CASSATELA, 1995; ADMAS e LLOYD et al., 1997) entre outras. Em pacientes asmáticos, após infecção viral ou em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, a IL-8 promove a quimiotaxia tanto de células polimorfonucleares como de mononucleares (Beaubien et al., 1990; RIBEIRO et al., 1991; CarrÉ et al. 1991; SEITZ et al., 1991; 1991; Boylan et al., 1994; Miller et al., 1992; GODBEY et al., 1993; MILLER e IDELL, 1990; Richman-Eisenstat et al., 1993; Broaddus e HEBERT., 1997; TERAN et al., 1997; VAN DEN HEUVEL et al., 1998) e o aumento da permeabilidade vascular (FUKUMOTO et al., 1998). Além disso, a IL-8 tem sido implicada em outras patologias como fibrose pulmonar, síndrome da angústia respiratória (SARA), bronquite crônica (Carre et al., 1991; Broaddus et al., 1992; Miller et al., 1992; Richman-Eisenstat et al., 1993), entre outras. A IL-8 pode também ser liberada não somente em resposta a um processo inflamatório, mas por macrófagos, que liberam outras citocinas, amplificando a resposta inflamatória (STANDIFORD et al., 1990). Outros estudos demonstram que existe uma correlação positiva entre os níveis de IL-8 e da mieloperoxidase na severidade dos sintomas respiratórios nas vias aéreas de humanos, após uma infecção viral (PEVERI et al., 1988). Além disso, a IL-8 é capaz de estimular a desgranulação de neutrófilos, promovendo a liberação de radicais livres (PEVERI et al., 1988), e a síntese de leucotrienos (SCHRODER, 1989). Acredita-se que esta

quemocina é também capaz de regular o influxo de neutrófilos, in vivo (TERAN et al., 1997).

A IL-6 é uma citocina liberada por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, monócitos, células T, mastócitos e células de origem neuronal (STEIN e SUTHERLAND, 1998). É a principal citocina envolvida na indução de proteínas de fase aguda, pelo fígado (XING et al., 1998). Já a IL-10, em camundongos, pode ser liberada por clones de células TH1 e TH2, monócitos, macrófagos, queratinócitos e células B CD25 positivas (HOWARD et al., 1992; O'GARRA et al., 1992). Esta citocina é considerada uma citocina pleiotrópica tendo em vista seu efeito biológico múltiplo, incluindo a inibição de citocinas pro-inflamatórias $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-8 e GM-CSF, MIP-1, MIP-2 liberadas por macrófagos (FIORENTINO et al., 1991; DE WAAL MALEYT et al., 1991; BOGDAN et al., 1991, 1992; OSWALD et al., 1992; STANDIFORD et al., 1995, 1996; SCHOLZ, 1996). A IL-10 também regula a expressão do IL-1RA liberada pelos monócitos (DE WAAL MALEYT et al., 1992; WANG et al., 1994).

Na clínica, tem sido observado aumento das concentrações de IL-10 no soro de pacientes com artrite reumatóide quando comparados aos pacientes normais. Neste caso, a IL-10 tem mostrado agir como uma citocina do tipo antiinflamatória (CUSH et al., 1995; SCHREIBER et al., 1995; 1998).

1.4.5 PARTICIPAÇÃO DO NF-KAPPA B NA INFLAMAÇÃO

Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao ácido deoxiribonucleico (DNA) celular, promovendo a regulação da expressão de

genes envolvidos nas respostas imunes, inflamatórias ou de enzimas relacionadas com a síntese de mediadores inflamatórios. Dentre esses fatores de transcrição, incluem-se o fator κ B (NF- κ B) e a proteína ativadora tipo 1 (AP-1). O NF- κ B tem sido alvo de muitos estudos, tendo em vista seu papel central na regulação da expressão de genes que codificam citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, bem como o seu envolvimento em diversas doenças inflamatórias crônicas e na rejeição de enxertos (BARNES, 1997; BURCKART et al., 1998; LEE e BURCKART, 1998; CHEN et al., 1999). A regulação e o controle da ativação do fator NF- κ B pode ser, portanto, a chave na estratégia terapêutica reduzindo a lesão e a liberação de mediadores inflamatórios (BÖHRER e NAWROTH, 1998; CHEN et al., 1999).

Muitos dos genes responsáveis pela síntese das citocinas pró-inflamatórias, TNF α (MÜLLER et al., 1993; REINECKER et al., 1994; BEUTLER e VAN HUFFEL., 1994), IL1 β (STEVENS, et al., 1992; PULLMAN et al., 1992; ANDUS et al., 1995), IL-6 (KISHIMOTO et al., 1995; KUSUGAMI et al., 1995), IL-8 (ANDUS et al., 1995; BAGGIOLINI et al., 1994), fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (MÜLLER et al., 1993), proteína quimiotática de monócitos (MCP) (BAEUERLE e HENKEL., 1994), NOS α , além da molécula de adesão vascular (VCAMS) (NEISH et al., 1992; IADEMARCO et al., 1992) e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) (BAEUERLE et al., 1991), possuem sítios de ligação para o NF- κ B. Dessa forma, parece que o fator NF- κ B está envolvido na regulação transcripcional

das citocinas, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, entre outras (LEONARDO et al., 1989; KUNSCH e ROSENI., 1990; SHAKHOV et al., 1990; BALDWIN, 1996). Por outro lado, algumas citocinas, como o $TNF\alpha$ e a $IL-1\beta$, são capazes de ativar também o fator $NF-\kappa B$ (GRILLI et al., 1993; BAEUERLE e HENKEL., 1994) ocorrendo assim, uma amplificação da resposta inflamatória (HISCOTT et al., 1993).

Os primeiros estudos acerca do $NF-\kappa B$ datam de 1986, quando foi descrito um fator nuclear necessário para a transcrição da cadeia leve Kappa das imunoglobulinas (SEM e BALTIMORE, 1986). O fator $NF-\kappa B$ é o nome genérico de um dos fatores de transcrição caracterizado em diversos tipos celulares de origem mesenquimal, incluindo linfócitos, macrófagos e fibroblastos (BAEUERLE, 1991; KAWAI et al., 1995; GHOSH et al., 1998). A análise cristalográfica, bem como estudos de biologia molecular, identificaram, em mamíferos, pelo menos 5 famílias: $NF-\kappa B_1$, $NF-\kappa B_2$, RelA, Rei B e a c-Rel (BALDWIN, 1996). Os fatores de transcrição $NF-\kappa B$ são compostos, geralmente, por diferentes proteínas, formando um complexo heterodímero, como, por exemplo, as proteínas p50 e p65, que formam a família RelA. Esse heterodímero está localizado no citoplasma celular (GRILLI, et al., 1993; BAEUERTE e HENKEL, 1994).

O $NF-\kappa B$, quando estimulado, age como um elemento regulador de transcrição (BALDWIN, 1996). O $NF-\kappa B$ é encontrado, na forma inativa, no citoplasma da maioria das células, onde está associado a proteínas inibitórias denominadas proteínas inibitórias do κB ($I\kappa B$) (MANIATIS, 1997; GHOSH et al., 1998). LPS, citocinas inflamatórias (TNF ou $IL-1$), irradiação ultra-violeta (UV),

oxidantes, agentes patógenos (infecção viral ou a expressão de produtos gênicos de origem virai), bem como estímulos fisiológicos e não-fisiológicos promovem a ativação do receptor NF- κ B (SHAKHOV et al., 1990; ADCOCK et al., 1994; DUMONT et al., 1998).

Após o estímulo, ocorre inicialmente a fosforilação (através de I κ B-quinases), seguida pela liberação, a degradação proteolítica do heterodímero e, finalmente, a translocação do complexo NF- κ B para o núcleo. No núcleo, o dímero NF- κ B ativado interage com elementos regulatórios do NF- κ B, promovendo alterações nas funções celulares (BALDWIN, 1996; MANIATIS, 1997; WORONICZ et al., 1997; GHOSH et al., 1998; ROGLER et al., 1998).

Estudos mostram que o NF- κ B é constitutivamente ativo em diversos tipos celulares (células B, timócitos, neurônios) (BALDWIN, 1996) e é também um componente importante na indução da expressão de diversas proteínas, incluindo citocinas, proteínas de fase aguda e moléculas de adesão celular (GRILLI, et al., 1993; KOPP e GHOSH, 1995; BALDWIN, 1996).

A ativação inadequada do NF- κ B tem sido implicada no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo as de origem auto-imune, como a artrite reumatóide e o lupus eritematoso sistêmico, além da asma ou de situações agudas como o choque séptico, a fibrose pulmonar, a glomerulonefrite, a aterosclerose, a síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), a oncogênese (BAEUERLE, 1991; KAWAI et al., 1995; BALDWIN, 1996). É interessante ressaltar que, na artrite reumatóide, o NF- κ B é capaz de induzir a expressão de genes relacionados à esta doença, é também ativado no tecido sinovial comprometido, e

a terapia utilizada, a prednisona e os sais de ouro, tem efeito inibitório sobre o fator NF- κ B (BAEUERLE, 1991; KAWAI et al., 1995; BALDWIN, 1996). Ao contrário, a inibição completa ou persistente do fator de transcrição nuclear NF- κ B tem sido associada à apoptose e ao desenvolvimento inadequado de células do sistema imunológico (CHEN et al., 1999). Finalmente, muitos inibidores endógenos do NF- κ B, como, por exemplo, a IL-10 (BARNES, 1997) podem ser úteis no tratamento das doenças inflamatórias crônicas.

Avanços no conhecimento do mecanismo de sinalização que controla a ativação do NF- κ B e o desenvolvimento de inibidores específicos representam uma importante etapa para o entendimento da resposta imune e inflamatória, sendo a inibição do NF- κ B funcionalmente importante, bem como terapia para o tratamento adequado de diversas doenças em que ocorre a desregulação desse fator de transcrição nuclear (BALDWIN, 1996; LEE e BURCKART, 1998; MAY, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A proposta do presente trabalho foi avaliar alguns dos mecanismos que regulam as respostas inflamatórias local (cavidade pleural) e sistêmica (sangue, pulmão e baço), utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Na resposta inflamatória da cavidade pleural

1- Avaliar a participação da mieloperoxidase e do óxido nítrico no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Para este fim, foi avaliado o perfil temporal (1-100 h) das concentrações de nitrito/nitrato e de mieloperoxidase no exsudato pleural. A participação de mediadores inflamatórios que estimulam a síntese do óxido nítrico foi também analisada, indiretamente, empregando-se diferentes drogas que interferem na ação ou na síntese da bradicinina, da histamina, da interleucina-1 (IL-1) e dos prostanóides. Estes dados resultaram na seguinte publicação:

FRÖDE-SALEH, TS; CALIXTO, JB; MEDEIROS, YS. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. Peptides, 20: 949-956, 1999.

2- Analisar a participação do receptor B₂ da bradicinina, utilizando antagonistas seletivos peptídicos (HOE 140, NPC 17731) e não peptídico (NPC 18884) do receptor B₂ da bradicinina. Estes dados resultaram na seguinte publicação:

SALEH, TS; VIANNA, RM; CRECZYNSKI-PASA, TB; CHAKRAVARTY, S; MAVUNKEL, BJK; CALIXTO, JB. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. Eur. J. Pharmacol. 363:179-187, 1998.

3- Investigar se citocinas do tipo pró ou antiinflamatórias exercem alguma modulação na primeira (4 h) e/ou segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos. Para este fim, foi utilizado citocinas-recombinantes do tipo: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, antagonista do receptor da IL-1 (IL1-RA), bem como anticorpos-policlonais: anti-TNF α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-8.

SALEH, T; SOUZA, GEP; CALIXTO, JB. The modulatory role of pro-inflammatory cytokines in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan (submetido à publicação).

4- Avaliar a participação do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (NF- κ B), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (4 e 48 h), em camundongos, com o auxílio de inibidores desse fator (PDTC e sulfasalazina).

SALEH, TS, CALIXTO, JB. Synergistic anti-inflammatory effect of NF- κ B inhibitors and steroidal or non steroidal anti-inflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice (in press).

5 - Avaliar as possíveis alterações na expressão de moléculas de adesão do tipo integrinas (CD11a, CD18) nos leucócitos da cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida pela carragenina.

2.2.2 Na resposta inflamatória sistêmica

1- Determinar se a resposta inflamatória pleural induzida pela carragenina também está associada com exsudação pulmonar ou esplênica.

2- Avaliar as possíveis alterações, na expressão antigênica de marcadores leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) no sangue total, no pulmão e no baço de animais onde a pleurisia foi induzida pela carragenina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

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

3.2 MODELO DE INFLAMAÇÃO UTILIZADO

3.2.1 *Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos*

Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos previamente (HENRIQUES et al., 1990; SALEH et al., 1996)

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

De acordo com cada protocolo experimental, após a administração do agente flogístico ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo com uma overdose de éter etílico. A seguir, foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30 a 45^o, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, os pulmões e ambas as cavidades pleurais foram expostos. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada

com 1 ml de solução salina tamponada (PBS-pH 7,6) e heparinizada (20 UI/ml). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipetas automáticas para a quantificação dos números total e diferencial de células.

De acordo com o protocolo experimental, uma hora antes dos experimentos, grupos de animais foram tratados com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml/ animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (HENRIQUES et al., 1990; HENRIQUES, 1993; SALEH et al., 1996). Utilizando o mesmo protocolo experimental, as possíveis variações sobre os índices de permeabilidade vascular, no pulmão, no coração, baço e nos rins foram também estudados.

3.2.2 *Pleurisia induzida pela bradicinina, pela desArg⁹-BK, pela histamina e pela substância P, em camundongos*

Os experimentos realizados estão de acordo com protocolos descritos previamente (SALEH et al., 1997; 1998; VIANNA e CALIXTO, 1998).

No dia da indução da pleurisia, os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e 0,1 ml de solução fisiológica estéril (0,9%) ou do agente flogístico (bradicinina (10 nmol/cav.), desArg⁹-BK (30 nmol/cav.), histamina (0,9 nmol/cav.) ou substância P (20 nmol/cav.), todos diluídos em salina 0,9%, foi administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal.

Com a finalidade de minimizar a degradação das cininas durante a pleurisia induzida pela bradicinina ou desArg⁹-BK, todos os animais foram tratados previamente com captopril (inibidor da cininase II, 5 mg/kg, i.p., 30 min) (CORRÊA e CALIXTO, 1993). De acordo com cada protocolo experimental, os animais foram

sacrificados, segundo a metodologia descrita anteriormente, em diferentes períodos de tempo.

Para cada série de experimentos, foi determinado o grau de exsudação e a quantificação do número total e diferencial de células da cavidade pleural, segundo protocolo descrito para a pleurisia induzida pela carragenina.

3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS

3.3.1 Determinação do exsudato na cavidade pleural

Nos animais submetidos à pleurisia induzida pela carragenina, após a lavagem das cavidades pleurais com solução PBS, uma alíquota (500 μ l) foi separada e congelada em freezer (-20^oC) para posterior determinação dos níveis de azul de Evans. No dia dos experimentos, amostras de um mesmo protocolo experimental foram descongeladas à temperatura ambiente e as concentrações do corante foram determinadas em espectrofotômetro (Campu-Espectro, Brasil), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 600 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01-50 μ g/ml) também tiveram suas densidades óticas determinadas, com auxílio da equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em μ g/ml.

3.3.2 Determinação da permeabilidade vascular em tecidos

Para avaliar a permeabilidade vascular de diferentes órgãos, inicialmente foram determinados os seus respectivos pesos (pulmão, coração, baço e rim) em gramas. Após repetidas lavagens, em solução PBS e remoção dos tecidos

adjacentes, os tecidos foram cortados em fatias e transferidos para tubo de ensaio contendo 2 ml de solução de formamida. As amostras foram incubadas em banho-maria (45°C) durante 72 h para posterior quantificação dos níveis de azul de Evans. Decorrido o período de incubação, os tubos de ensaio foram centrifugados (10 min, 50 x g) e os sobrenadantes foram transferidos para cubetas para medida das concentrações do azul de Evans, que foi realizada segundo a metodologia descrita no modelo da pleurisia. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em µg/g de tecido úmido.

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

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 µl) foram reservadas para a contagem celular total, em contador de células automático (Coulter, E.U.A.), e para a realização de esfregaços celulares. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Shandon, E.U.A.), estes foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi feita em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 800 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Em alguns experimentos, os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e as amostras de sangue total foram coletadas através da punção cardíaca em tubo contendo anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético: E.D.T.A.).

3.3.4 Determinação da mieloperoxidase nas amostras colhidas do lavado pleural

- **Método quantitativo**

Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. Imediatamente após a morte dos animais, amostras do lavado pleural de camundongos-controle (injetados com solução salina 0,9%) ou tratados com carragenina (1%) foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação das concentrações de mieloperoxidase. Volumes de 40 μ l do lavado ou do padrão (mieloperoxidase de neutrófilos humanos (Sigma M-6908): 0,7-140 mU/ml) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360 μ l de meio tampão (0,167 mg/ml de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂ (RAO et al., 1993). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μ l de azida sódica (1%). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50 x g, 5 min) e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em espectrofotômetro (Hitachi U-2001-modelo121-0031, E.U.A.). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/ml) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU/ml, com o auxílio da equação da reta. As amostras em que a concentração da mieloperoxidase foi superior a 140 mU/ml foram diluídas (2 a 5 vezes) em solução PBS e suas concentrações finais foram adequadamente corrigidas. Os valores abaixo do limite inferior da curva-padrão foram expressos como 0,7 mU/ml.

- **Método imunohistoquímico**

Esfregaços de alíquotas do lavado pleural obtidas de animais-controle ou tratados com carragenina (1%) foram realizados com auxílio de citocentrífuga (Shandon, E.U.A.). Após secagem à temperatura ambiente, estes foram corados segundo a técnica proposta por Graham-Knoll (HAYHOE e FLEMAN, 1995). Para a realização da metodologia, inicialmente, os esfregaços foram fixados em etanol (5 min). Imediatamente, foi preparada solução de benzidina (benzidina: 250 mg e água destilada: 20 ml, aquecida em banho-maria, à 100^oC por 10 min e resfriada à temperatura ambiente). A solução resfriada, foi colocada em cubas de Koplín onde as lâminas foram mergulhadas (3 min). A seguir, foi adicionado, à solução de benzidina, 3 gotas de peróxido de hidrogênio (10 vol) e novamente as lâminas foram incubadas (3 min) na nova solução. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente (10 segundos) e secas à temperatura ambiente. A seguir, realizou-se uma contra coloração utilizando-se corante Giemsa diluído (1:20) (HAYHOE, 1995). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum, utilizando-se objetiva de imersão e aumento de 1000 vezes. A positividade para a mieloperoxidase é caracterizada pela coloração amarelo-ouro, de aspecto granuloso do citoplasma celular.

3.3.5 Análise quantitativa do nitrito/nitrato nas amostras colhidas do lavado pleural

O óxido nítrico foi quantificado pela formação de seus metabólitos nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante

azul de Evans. As amostras do lavado da cavidade pleural de camundongos tratados com solução salina, carragenina e/ou com diferentes drogas foram coletadas, armazenadas em frascos Eppendorf e estocadas em freezer a -20°C . No dia dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e foram desproteinizadas adicionando-lhes hidróxido de sódio (6 mM) e sulfato de zinco (0,6%). A seguir, 250 μl do lavado da cavidade pleural foi diluído em uma solução contendo formato de amônio (30 μl), fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (30 μl) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922 (30 μl): diluída (1:10) em tampão PBS. A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C , e a seguir, centrifugada (50 x g, 5 min). Cerca de 250 μl do sobrenadante foi transferido para uma cuveta, onde o mesmo volume de solução de Griess: fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (5% (vol/vol), ácido sulfanílico (1%) e N-(1-naftil) etilenodiamino) (0,1%) foi adicionado e incubado durante 10 min, à temperatura ambiente.

A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em espectrofotômetro (Hitachi U2001, modelo 121-0031, E.U.A.) em 543 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.

3.3.6 Determinação dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25) no lavado pleural e no sangue total de animais com pleurisia

As amostras do lavado pleural foram lavadas, inicialmente, com solução de PBS mais azida (1%), com a finalidade de retirar o excesso de muco ou outros ligantes inespecíficos que possam interferir eventualmente na reação estudada. Assim, as amostras (500 µl) foram transferidas para tubos de ensaio, onde foi adicionado 500 µl de solução PBS mais azida (1%) e centrifugadas (5 min, 50 x g). A seguir, os sobrenadantes foram desprezados e os *pellets* ressuspensos e homogeneizados com 1 ml de solução PBS. Após este procedimento, 50 µl de amostras do sangue total e do lavado pleural foram marcados individualmente utilizando anticorpos monoclonais de rato anti-camundongo (1 µl) ligados ao corante isotiocianato de fluoresceína (I.T.C.F.) (CD8, CD11a, CD18, CD25 e CD45, respectivamente). Nesta etapa dos experimentos, 50 µl de soro de cabra inativado (56°C, 30 min) e diluído 1/10 (em solução PBS), foi utilizado com a finalidade de remover ligações inespecíficas adicionais. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (20 min), ao abrigo da luz. A seguir, solução-lisante para células com ativação fluorescente (Optilize B, 100 µl) foi adicionada e as amostras incubadas novamente à temperatura ambiente (10 min), sendo posteriormente adicionado 1 ml de água destilada. Para cada amostra, foram analisadas, no mínimo, 10⁵ células em separador de células com ativação fluorescente (FACScan - *fluorescence-activated cell sorter*, FACSCalibur, Becton-Dickinson, E.U.A.), de acordo com a dispersão de luz frontal e lateral (FALS - *Forward angle Light Scatter sensor*) e a intensidade de fluorescência utilizando o

software CellQuest e Paint agate (Becton-Dickinson, E.U.A.). Paralelamente, isotipos controles para o anticorpo monoclonal ligado ao corante I.T.C.F. foi utilizado. Os resultados foram expressos em percentual de antígenos leucocitários no total de células analisadas.

3.3.7. Determinação dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) em tecidos de animais com pleurisia

Para análise dos antígenos leucocitários, as amostras teciduais dos pulmões e do baço foram lavadas com solução PBS e após remoção dos tecidos adjacentes, *pool* destes órgãos (n = 3-4 animais) de cada grupo experimental foram picotados, com auxílio de lâmina de bisturi e transferidos para tubos de ensaio de vidro. A seguir, adicionou-se solução PBS (500 μ l), sendo as amostras imediatamente homogeneizadas e 2,5 ml da solução foi utilizada para a separação das células através de gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (densidade 1077). Assim, em tubo de vidro, contendo 2,5 ml de solução Ficoll-Hypaque, adicionou-se a mesma quantidade (2,5 ml) do homogeneizado. A solução foi centrifugada (50 x g, 30 min) e a camada celular foi retirada com auxílio de seringa de 5 ml e agulha (calibre 22G x 3,5 polegadas) e transferidos para outro tubo de vidro. Posteriormente, solução PBS (500 μ l) foi adicionada à camada celular e o excesso de Ficoll-Hypaque foi removido através de centrifugação (50 g x 10 min) da solução. Após esta etapa, os *pellets* foram ressuspensos em 500 μ l de solução PBS. Anticorpos monoclonais de rato anti-camundongo (1 μ l) ligados ao corante I.T.C.F. (CD8, CD11a, CD18, CD25 e CD45, respectivamente) foram adicionados

à 50 µl das células lavadas e incubados à temperatura ambiente (20 min), ao abrigo da luz. Para remover ligações inespecíficas adicionais, as amostras da suspensão celular foram também simultaneamente incubadas com 50 µl de soro de cabra inativado (56°C, 30 min), diluído 1:10 em solução PBS. Posteriormente, solução-lisante para células com ativação fluorescente (Optilize B, 100 µl) foi adicionada e as amostras incubadas novamente à temperatura ambiente (10 min), seguido-se da adição de 1 ml de água destilada. Paralelamente, isotipo-controle para o anticorpo monoclonal associado ao I.T.C.F. foi utilizado. Para cada amostra, foram analisadas, no mínimo, 10⁵ células em separador de células com ativação fluorescente (FACScan - *fluorescence-activated cell sorter*, FACSCalibur, Becton-Dickinson, E.U.A.), de acordo com a dispersão de luz frontal e lateral (FSC - *Forward Light Scatter*) e a intensidade de fluorescência utilizando o programa CellQuest e Paint agate (Becton-Dickinson, E.U.A.). Paralelamente, isotipos controles para o anticorpo monoclonal ligado ao corante I.T.C.F. foi utilizado. Os resultados foram expressos em percentual de antígenos leucocitários no total de células analisadas.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.4.1 *Determinação das concentrações da mieloperoxidase e de nitrito/nitrato no lavado pleural*

As concentrações de mieloperoxidase e do nitrito/nitrato obtidas do lavado pleural de animais-controle e tratados com carragenina (1%) em diferentes períodos de tempo (1-100 h) foram inicialmente determinados. Paralelamente, a

participação do óxido nítrico, neste modelo experimental foi também indiretamente avaliada, utilizando-se agentes inibidores da síntese da óxido-nítrico-sintase (L-NOARG: 1-100 pmol/cav.) na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Os animais foram inicialmente (30 min) tratados com L-NOARG (1-100 pmol/cav.) e a pleurisia induzida pela carragenina (1%). Os parâmetros inflamatórios (exsudação e migração celular) foram analisados 4 h após. Em outros experimentos foi também avaliado o perfil temporal inibitório da L-NOARG (100 pmol/cav.). Neste protocolo, os animais foram tratados previamente em diferentes intervalos de tempo (0,5-48 h) e a pleurisia pela carragenina foi induzida, sendo os parâmetros inflamatórios analisados 4 h após.

3.4.2 Efeitos de drogas antiinflamatórias sobre os níveis da mieloperoxidase e do nitrito/nitrato

A participação de mediadores derivados da via do ácido araquidônico, como também de citocinas do tipo IL-1, bradicinina e histamina, foi também analisada com auxílio de diferentes drogas que interferem na ação ou na síntese destes agentes. De acordo com protocolos descritos na literatura e de testes realizados previamente no laboratório de inflamação da Coordenadoria Especial de Farmacologia/UFSC, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (30 min) com indometacina, meloxicam, nabumetona (inibidores da via da ciclooxigenase, 5 mg/kg, i.p., 5 mg/kg, v.o. e 50 mg/kg, v.o., respectivamente), dexametasona (inibidor da síntese de citocinas, da fosfolipase A₂, da expressão da enzima NO-sintase e da COX-2, entre outros, 0,5 mg/kg, i.p.), diacereína (inibidor do número de receptores para a IL-1, 50 mg/kg, v.o.), HOE 140 e NPC

17731 (antagonistas seletivos do receptor B₂ da bradicinina, 1 pmol/cav.), terfenadina (antagonista seletivo do receptor H₁ da histamina, 50 mg/kg, i.p.). A análise dos parâmetros estudados foi realizada 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina (SALEH et al., 1996).

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

3.4.3 Análise farmacológica do efeito de antagonistas peptídicos e não-peptídicos do receptor B₂ da bradicinina, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina

Os animais foram inicialmente tratados (30 min) com antagonistas seletivos do receptor B₂ da bradicinina, NPC 17731 e HOE 140. Neste grupo de experimentos, o NPC 17731 (0,01-10 pmol/cav.) ou o HOE 140 (0,001-10 pmol/cav.) foram administrados e os parâmetros inflamatórios (migração celular e exsudação) analisados 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina. Em outros grupos de experimentos, foi também avaliado o perfil temporal do efeito dos dois antagonistas estudados. Assim, foi escolhida uma dose de cada droga (NPC 17731 e HOE 140, 1 pmol/cav.) e os animais foram tratados previamente em diferentes intervalos de tempo (30 min-48 h). Os parâmetros inflamatórios foram analisados 4 h após.

Para confirmar os resultados anteriores, foi utilizado um novo antagonista não peptídico seletivo para o receptor B₂ da bradicinina, o NPC 18884. Neste grupo de experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados (30 min antes) com diferentes doses do NPC 18884, administrado pelas vias i.p. (1-300 nmol/kg) e v.o. (100-1200 nmol/kg) e os índices inflamatórios (leucócitos e exsudação) foram analisados 4 h após a indução da pleurisia. O perfil temporal inibitório deste antagonista foi também avaliado, sendo, os animais, previamente tratados em diferentes intervalos de tempo (30 min-8 h).

A seletividade deste novo antagonista do receptor B₂ da bradicinina (NPC 18884) foi avaliada comparando-se seus efeitos nos modelos de pleurisia induzida por esta cinina, pela des-Arg⁹-BK, pela histamina e pela substância P.

No primeiro grupo de experimentos, a pleurisia foi induzida pela bradicinina (10 nmol/cav.) (SALEH et al., 1997). Diferentes grupos de animais foram tratados com NPC 18884 (10-100 nmol/kg, i.p.) ou (100-600 nmol/kg, v.o.), 30 min antes da bradicinina. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após. O perfil temporal inibitório (30 min a 4 h) desse antagonista, pelas vias i.p. ou oral, foi também analisado, neste modelo experimental.

Em outro grupo de experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados com o NPC 18884 (100 nmol/kg, i.p.) ou (600 nmol/kg, v.o.) 30 min antes da indução da pleurisia pela desArg⁹-BK. Os parâmetros inflamatórios foram analisados 1 e 4 h para avaliar a exsudação e a migração celular, respectivamente (VIANNA e CALIXTO, 1998).

Finalmente, o efeito do NPC 18884 foi avaliado na pleurisia induzida pela histamina (0,9 nmol/cav.) e pela substância P (20 nmol/cav.), respectivamente.

Nestes protocolos experimentais, os animais foram tratados previamente (30 min) com o NPC 18884 (1200 nmol/kg, v.o.) e os parâmetros inflamatórios foram analisados 1 e 4 h, respectivamente.

3.4.4 Análise da participação de citocinas ($TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina

Em experimentos preliminares (resultados não mostrados), foram testados diferentes intervalos de tempo, bem como diferentes doses de citocinas ou anticorpos-policlonais anti-citocinas para determinar, tanto a melhor dose, como o período adequado de tratamento prévio. Com base nesses protocolos iniciais, os períodos de tratamento prévio, tanto das citocinas como dos seus respectivos anticorpos-policlonais, foram estabelecidos, sendo tais drogas administradas 5 ou 30 min, respectivamente, antes da carragenina (1%/cav.).

No dia dos experimentos, 0,1 ml de diferentes doses de uma das citocinas-recombinantes estudadas ($TNF\alpha$ murino: (0,001-50 ng/cav.), IL-1 β murino (0,01-50 ng/cav.), IL-8 humana (10-100 ng/cav.), IL-6 murino (5-100 ng/cav.), IL-10 humana (5-40 ng/cav.) ou dos respectivos anticorpos-policlonais (anti- $TNF\alpha$ murino (0,001-100 ng/cav.), anti-IL-1 β murino (5-100 ng/cav.), anti-IL-8 humana (5-100 ng/cav.), anti-IL-6 murino (0,001-50 ng/cav.), foram administrados, por via intrapleural, 5 ou 30 min antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina (1%). Os parâmetros inflamatórios (migração celular e exsudação) foram analisados 4 e 48 h após. A participação do receptor da IL-1 neste processo inflamatório foi também estudado. Para este fim, foi administrado, o antagonista

natural do receptor da IL-1, o IL1-RA (0,1-100 µg/cav., 30 min antes), e os mesmos parâmetros inflamatórios foram analisados 4 e 48 h após a indução da pleurisia pela carragenina.

Grupos de animais-controle receberam o mesmo volume (0,1 ml) da injeção intrapleural de solução salina estéril e, quando necessário, do veículo utilizado para diluir as citocinas ou os respectivos anticorpos-policlonais testados.

3.4.5 Análise da participação do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina

A-) Efeito de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (PDTC: pirrolidineditiocarbamato e sulfasalazina)

Neste grupo de experimentos, os animais foram tratados previamente (60 min) com diferentes doses do PDTC (25-200 mg/kg, i.p.) ou da sulfasalazina (25-300 mg/kg, i.p.). Os parâmetros inflamatórios (exsudação e migração celular) foram analisados na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina. Em outros experimentos, o perfil temporal inibitório (5-120 min) do PDTC (100 mg/kg, i.p.) ou da sulfasalazina (200 mg/kg, i.p.), neste modelo experimental de inflamação, foi também analisado. Em cada grupo de experimentos, incluíram-se animais-controle, os quais foram tratados com o veículo utilizado para diluir os agentes inibitórios relatados.

Em relação à segunda fase (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (60 min) com PDTC (100 e 200 mg/kg, i.p.) ou sulfasalazina (200 e 300 mg/kg, i.p.). Os

parâmetros inflamatórios (migração celular e exsudação) foram avaliados 48 h após a indução da pleurisia.

B-) Efeito da associação de doses subliminares de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (PDTC e sulfasalazina) com drogas antiinflamatórias

Os animais foram tratados previamente com uma associação de doses subliminares de drogas antiinflamatórias (indometacina 0,5 mg/kg, i.p.; meloxicam 0,5 mg/kg, v.o.; nabumetona 5 mg/kg, v.o.; diacereína 5 mg/kg, v.o.; dexametasona 0,05 mg/kg, i.p. e com PDTC (10 mg/kg, i.p.) ou sulfasalazina (10 mg/kg, i.p.). Os tempos de tratamento prévio foram de 90 min e 60 min antes da carragenina para as drogas antiinflamatórias e para os inibidores do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B, respectivamente. As doses escolhidas das drogas utilizadas, isoladamente, não apresentaram efeito inibitório sobre os parâmetros inflamatórios analisados (exsudação e migração celular), 4 h após.

3.4.6 Estudo dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25) no lavado pleural e no sangue total de animais com pleurisia

A expressão de antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) nos exsudatos e no sangue total foram estudados com auxílio de marcadores específicos ligados ao corante I.T.C.F. Nos experimentos de pleurisia, amostras do grupo-controle e tratados (Cg 4 e 48 h) foram preparadas segundo protocolo mencionado anteriormente. As amostras de sangue total foram coletadas por punção cardíaca, em tubo de vidro contendo solução de E.D.T.A.

3.4.7 Estudo dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) em tecidos de animais com pleurisia

Após indução da pleurisia pela carragenina (1%) e de acordo com o protocolo experimental, os animais foram sacrificados com overdose de éter etílico e os pulmões e o baço foram removidos e preparados de acordo com a técnica descrita anteriormente (animais com pleurisia: 4 e 48 h após a administração do agente flogístico).

3.5 DROGAS

No estudo aqui relatado, utilizaram-se as seguintes drogas: bradicinina, carragenina lambda (grau IV), dexametasona, terfenadina, indometacina, L-NAME (N^o-nitro-L-arginina metilester), L-NOARG (N^o-nitro-L-arginina benzil éster), benzidina, etanol, o-dianizidina 2HCl (3,3'dimetioxibenzedina), azida sódica, *Escherichia coli* (E.C. ATCC 25922), mieloperoxidase de neutrófilos humanos (MPO: 20 U/mg de proteína; 1 unidade de MPO é definida como a atividade da enzima capaz de oxidar 1 μ mol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por minuto à 25^oC, anticorpos de rato anti-camundongo ligado ao corante isotiocianato de fluoresceína (I.T.C.F.): anti-CD8, CD11a, CD18, CD25 e CD45, pirrolidinoditiocarbamato (PDTC), substância P (Sigma Chemical Co., E.U.A.); Ficoll-Hypaque 1077 (Inlab, Brasil); des-Arg⁹-bradicinina (Península, E.U.A.); HOE 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-tic⁷, Oic⁸]-bradicinina (Hoescht, Alemanha); NPC 17731 (D-Arg⁰[Hyp³, D-Hyp^E(transpropil⁷)Oic⁸]-bradicinina, NPC 18884 (Scios Nova Pharmaceutical Corporation, E.U.A.); meloxicam (Boehringer Ingelheim, Brasil); diacereína (TRB Pharma, Brasil); nabumetona (Smithkline Beecham

Pharmaceuticals, Brasil), sulfasalazina (APSEN, Brasil); ácido sulfanílico, fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado, peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30%), dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamino, sulfato de zinco septahidratado, azul de Evans, ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.), solução tampão fosfato (PBS – pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM (Merck, Brasil); formamida, hidróxido de sódio (Reagen, Brasil); formato de amônio (Riedel-de-Häen, Alemanha), TNF α murino, IL-1 β murino, IL-6 murino, IL-8 humana, IL-10 humana, IL1-IRA murino, e anticorpos-policlonais de cabra: anti-TNF α murino, anti-IL-1 β murino, anti-IL-6 murino, anti-IL-8 humana (R & Systems Inc, E.U.A.); solução- lisante para células marcadas com corante fluorescente (FACS: Optilize B (Coulter, E.U.A.); solução salina (NaCl 0,9%), fosfato de sódio, corante Giemsa e May-Grunwald-Giemsa de diferentes fontes comerciais.

Soluções estoques de indometacina foram preparadas em solução de NaHCO₃ (5%), PDTC e sulfasalazina em etanol (5%) e as demais drogas em PBS. Todas as citocinas foram diluídas em solução PBS ou água destilada e armazenadas em frascos de Eppendorf à -70^oC. As demais drogas foram previamente preparadas e mantidas em freezer (-20^oC). No dia dos experimentos, quando necessário, as diluições das drogas foram realizadas em solução salina estéril (0,9%) ou PBS à temperatura ambiente.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (exsudação e migração celular) foram expressos através da média \pm erro padrão da média

(e.p.m.). Quando necessário, os valores da DI_{50} foram calculados em relação ao número total de células. Expressaram-se as últimas variáveis por suas médias geométricas acompanhadas pelos respectivos (95%) limites de confiança (LC). O índice (DI_{50}) corresponde à dose necessária do antagonista para reduzir em 50% a mesma variável em relação aos controles (tratados apenas com o agonista).

Para padronização dos cálculos, nos experimentos com antagonistas, os valores individuais do número total de células foram subtraídos dos respectivos valores médios do grupo controle (animais tratados somente com salina).

Diferenças estatísticas entre migração celular e exsudação e entre grupos-controle foram determinadas utilizando-se os testes "t" de Student não-pareado. Quando necessário, o teste de ANOVA foi complementado pelo teste de Dunnett.

Para avaliação estatística dos valores do nitrito/nitrato e da mieloperoxidase, utilizaram-se os testes de Mann-Witney ou Kruskal-Wallis. Para analisar a correlação entre as variáveis (níveis de nitrito/nitrato ou da mieloperoxidase) e total e diferencial de células empregou-se o teste de Spearman.

Para avaliação estatística dos valores percentuais dos antígenos leucocitários anti-moléculas de CD8a, CD11a, CD18, CD25, CD45, bem como a variação do extravasamento de azul de Evans, em diferentes órgãos, no modelo de pleurisia, utilizou-se ANOVA (testes paramétricos e não-paramétricos), quando necessário complementados com o teste de Dunnett (para análise paramétrica) ou Dunn (para análise não-paramétrica).

Para todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da resposta inflamatória local no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

4.1.1 Evidências da participação da mieloperoxidase e do óxido nítrico

A-) Análises quantitativa, imunohistoquímica e farmacológica

Nesta série de experimentos foi determinado o perfil temporal (1-100 h) das concentrações de mieloperoxidase e de nitrito/nitrato. Em animais-controle (tratados com solução salina), os níveis (mediana e amplitude) de mieloperoxidase e de nitrito/nitrato encontrados na cavidade pleural foram de 3,0 (2-3,4) mU/ml e de 2,5 (0-4,9) μ M, respectivamente (Figura 1).

Como mostrado na Figura 1 A, a carragenina (1%) administrada na cavidade pleural de camundongos promoveu aumento significativo no nível de mieloperoxidase, com picos em 4 h (mediana: 537,5; amplitude: 323,6-683,7 mU/ml) e 6 h (mediana: 292,5; amplitude: 250,0-300,0 mU/ml) após a indução da pleurisia ($P < 0,01$). Ao contrário, nenhuma mudança significativa desse parâmetro foi observado na segunda fase (48 h) desta resposta inflamatória ($P > 0,05$).

A Figura 2 mostra os esfregaços típicos de leucócitos colhidos das cavidades pleurais de animais tratados com salina (Figura 2A) e com carragenina (1%, 4 h) (Figura 2B) e que foram corados para a avaliação qualitativa da mieloperoxidase. A positividade para a mieloperoxidase é caracterizada pela coloração amarelo-ouro, de aspecto granuloso, no citoplasma celular (Figura 2B).

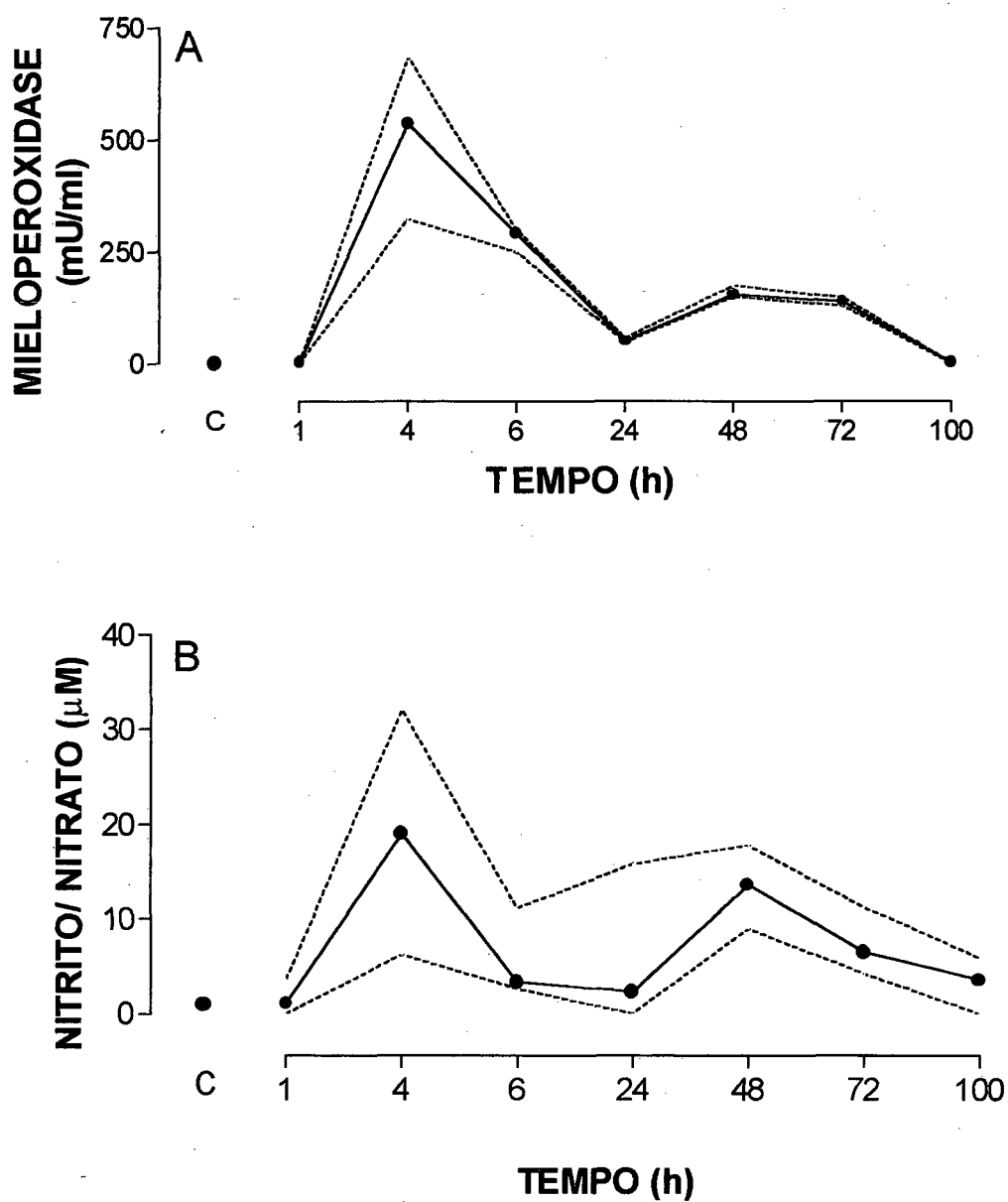


Figura 1- Perfil temporal dos níveis da mieloperoxidase (A) e do nitrito/nitrato (B) determinados na cavidade pleural de animais tratados com carragenina (1%). C = animais tratados com salina estéril (0,9%). Os círculos e linhas cheias representam a mediana e as amplitudes dos níveis da mieloperoxidase (U/ml) e do nitrito/nitrato (µM) obtidos de 6-10 animais, e as linhas tracejadas, as respectivas amplitudes.

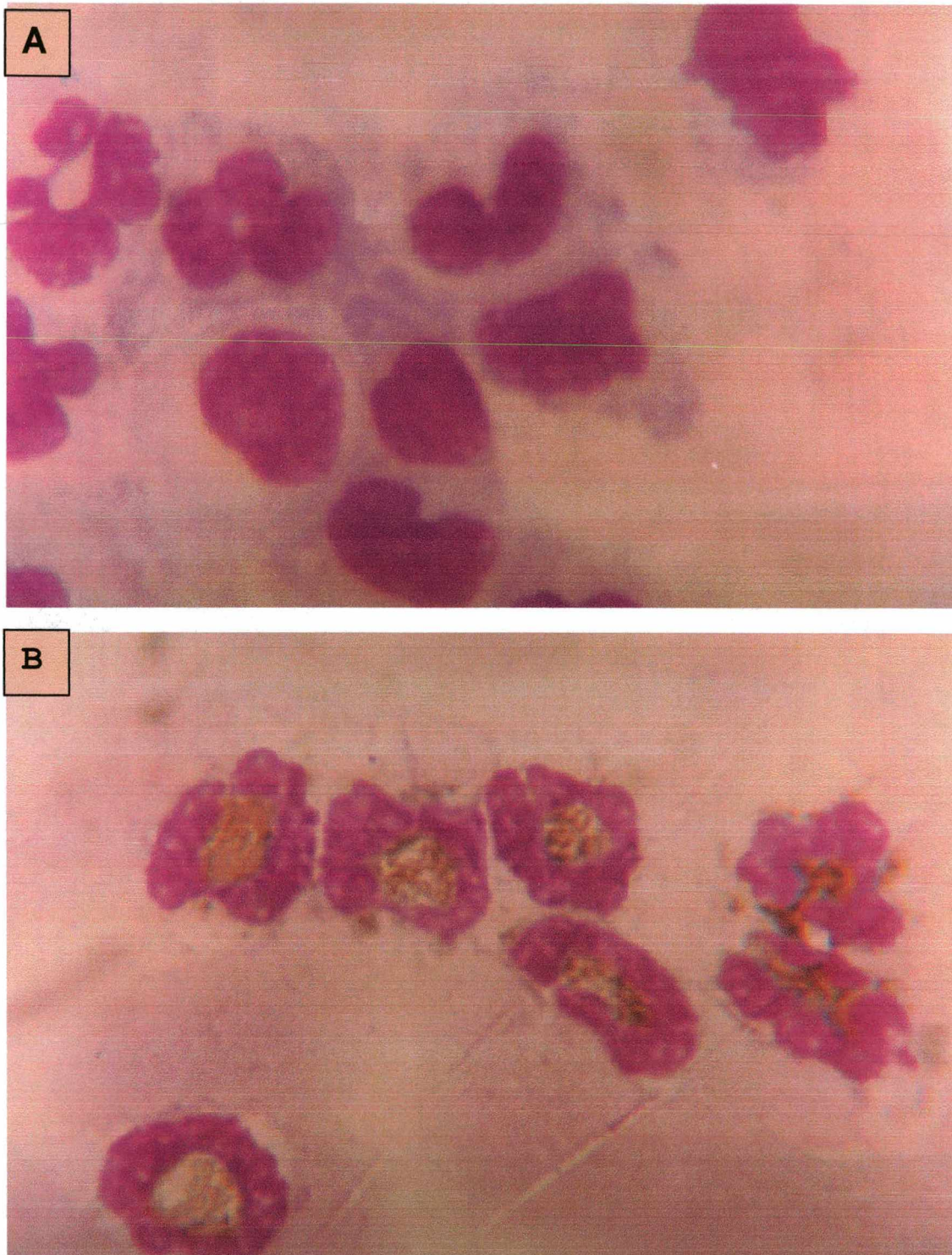


Figura 2- Esfregaço típico de amostras de animais-controles (tratados com salina estéril) (A) e tratados com carragenina (1%, 4 h) (B) colhidas da cavidade pleural de camundongos. Os esfregaços foram corados de acordo com a técnica de Graham-Knoll modificada. A coloração amarelo-ouro é representativa de positividade para a mieloperoxidase.

A administração intrapleural da carragenina causou também aumento nas concentrações (mediana e amplitude) de nitrito/nitrato, com picos em 4 h (mediana: 19; amplitude: 6,2-32 μM) e 48 h (mediana: 13,7; amplitude: 8,9-17,8 μM) ($P < 0,01$) (Figura 1B).

Paralelamente, ao aumento nas concentrações de mieloperoxidase (4 h) e de nitrito/nitrato (4 e 48 h), constatou-se aumento tanto da migração celular (média \pm e.p.m.: 4 h: $5,6 \pm 0,2 \times 10^6$ e 48 h: $10,2 \pm 0,9 \times 10^6$) como da exsudação (média \pm e.p.m.: 4 h: $7,5 \pm 0,2$ mg/ml e 48 h: $10,4 \pm 0,7$ mg/ml) (SALEH et al., 1996). Nesta série de experimentos, uma correlação positiva e significativa entre os níveis de neutrófilos e as concentrações de mieloperoxidase ($r = 0,67$; $P < 0,01$) foi observada. Nenhuma correlação foi constatada entre os níveis de nitrato, o número total de leucócitos e a contagem diferencial celular ($r = 0,1$; $P > 0,05$).

A participação do óxido nítrico também foi avaliada indiretamente, utilizando-se agentes inibidores da síntese da óxido-nítrico sintase (L-NOARG: 1-100 pmol/cav.), na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos (Figura 3A). A L-NOARG, nas doses de 30 a 100 pmol, 30 min antes, promoveu inibição tanto da exsudação quanto da migração celular, enquanto doses de 1 a 10 pmol/cav., apenas inibiram a exsudação ($P < 0,01$). O perfil temporal (30 min a 48 h) desse inibidor da síntese da enzima NO-sintase (100 pmol/cav.) é mostrado na Figura 3B. A L-NOARG administrada na dose de 100 pmol/cav. de 30 min a 24 h inibiu a migração celular e a exsudação ($P < 0,01$), 4 h após a administração da carragenina. O tratamento prévio (48 h) com este agente., foi capaz de inibir somente a exsudação ($P < 0,01$) (Figura 3B).

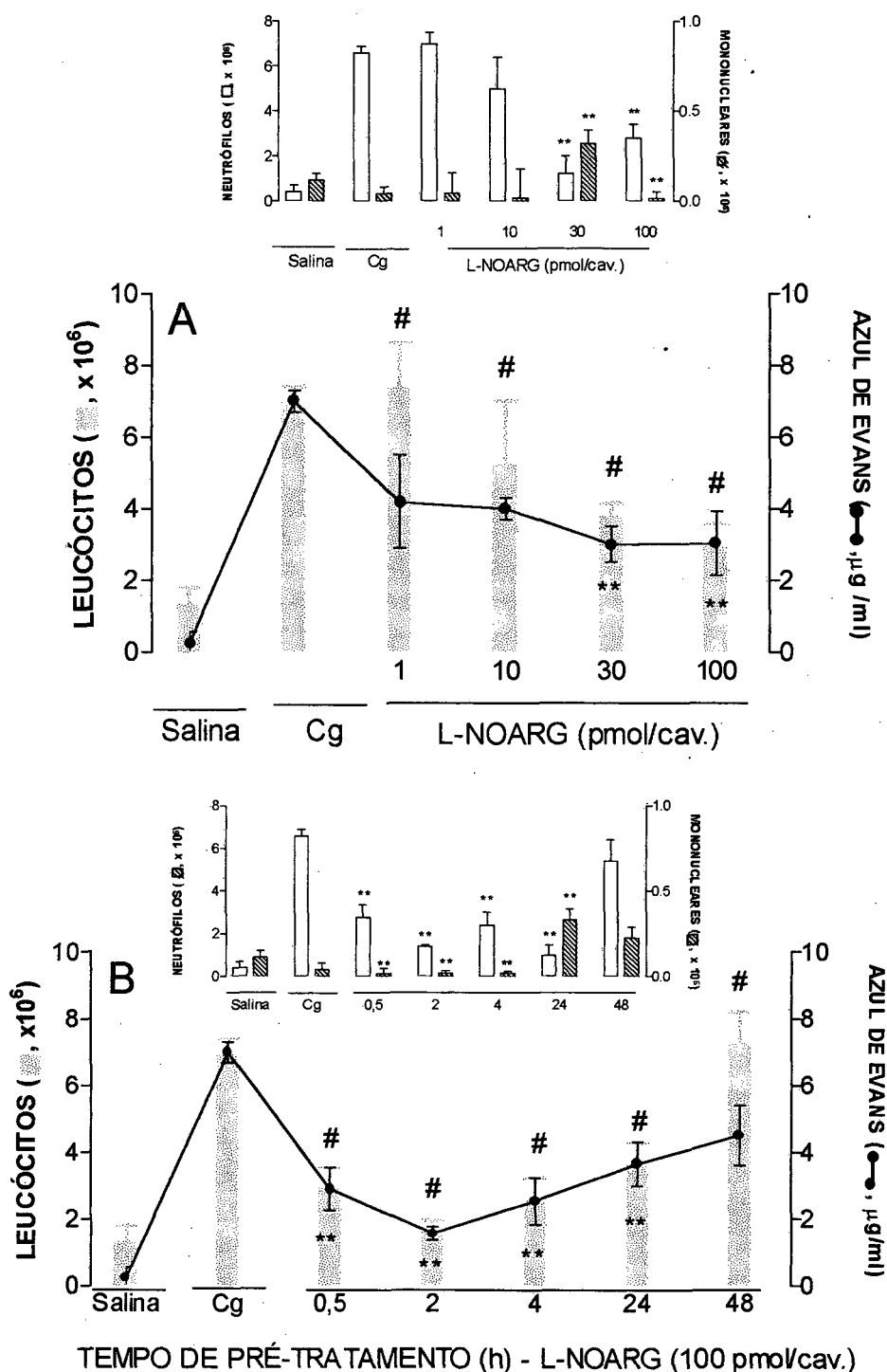


Figura 3- Efeito da L-NOARG, sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da L-NOARG (1-100 pmol/cav.), administradas 30 min antes da carragenina. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%, 4 h). B – Efeito da L-NOARG (100 pmol/cav.), administrada de 30 min a 48 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas ou símbolos.

B-) Efeitos de drogas antiinflamatórias sobre os níveis de nitrito/nitrato e da mieloperoxidase

Todas as drogas utilizadas (terfenadina, HOE 140, NPC 17731, diacereína, indometacina, meloxicam, nabumetona e dexametasona) foram efetivas em inibir significativamente a migração celular induzida pela carragenina 4 h após sua administração na cavidade pleural de camundongos ($P < 0,01$) (Tabela 4, Figuras 5 e 6). No entanto, apenas a diacereína foi capaz de normalizar a celularidade na cavidade pleural. Em relação à exsudação, todas as drogas utilizadas, com exceção da diacereína, também inibiram esse parâmetro ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Nas mesmas condições experimentais, as concentrações da mieloperoxidase foram significativamente reduzidas, quando os animais foram tratados com os mesmos agentes (Figura 4A e B) ($P < 0,01$). Nesta série de experimentos, a diacereína, a nabumetona, a L-NOARG e a L-NAME também causaram inibição significativa nos níveis de nitrito/nitrato ($P < 0,01$) (Figura 4 C e D).

Em relação à segunda fase (48 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural, drogas antiinflamatórias do tipo não-esteroidal (indometacina, meloxicam e nabumetona) ou antagonistas seletivos do receptor B_2 da bradicinina (HOE 140 e NPC 17731) não modificaram significativamente tanto a migração celular como a exsudação (Tabela 5). Na mesma condição experimental, a dexametasona e a diacereína, administradas 30 min antes do agente flogístico, inibiram significativamente a migração celular ($P < 0,01$), enquanto que a terfenadina reduziu apenas a exsudação ($P < 0,05$). É importante ressaltar que o grau de inibição causado por essas drogas nos parâmetros estudados foi menor quando comparados àqueles observados na primeira fase

(4 h) da resposta inflamatória estudada (Tabelas 4 e 5, Figuras 5 e 6). Além disso, nenhuma das drogas utilizadas causou qualquer mudança nos níveis de nitrito/nitrato (resultados não mostrados).

Tabela 4- Efeito do tratamento prévio de animais com várias drogas na primeira fase (4 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos

Grupo	Leucócitos (x 10 ⁶)	Neutrófilos (x 10 ⁶)	Mononucleares (x 10 ⁶)	Exsudato ^a (μg/ml)
Salina ^d	1,3±0,2	0,1±0,1	1,2±0,2	0,02±0,1
Carragenina ^d	5,6±0,2	5,0±0,1	0,6±0,5	7,5±0,2
Terfenadina ^b (50 mg/kg)	3,3±0,1‡	1,4±0,6‡	1,9±0,5	1,4±0,1‡
Indometacina ^b (5 mg/kg)	2,8±0,6‡	1,0±0,3‡	1,8±0,4	0,6±0,3‡
Meloxicam ^c (5 mg/kg)	2,6±0,2‡	2,3±0,2‡	0,3±0,2‡	2,8±0,1‡
Nabumetona ^c (50 mg/kg)	2,0±0,3‡	0,9±0,1‡	1,1±0,4	4,0±0,2‡
Diacereína ^c (50 mg/kg)	1,2±0,2‡	0,6±0,1‡	0,6±0,1‡	4,6±0,5
Dexamatasona ^b (0,5 mg/kg)	2,3±0,4‡	0,6±0,2‡	1,7±0,3	0,3±0,4‡
HOE 140 ^d (1 pmol)	1,5±0,1‡	1,4±0,1‡	0,1±0,1‡	0,5±0,3‡
NPC 17731 ^d (1 pmol)	3,1±0,2‡	2,9±0,2‡	0,2±0,2‡	0,8±0,2‡

Os parâmetros foram analisados 4 h após a administração da carragenina ou da salina estéril (0,9%) na cavidade pleural de camundongos. a – Avaliado através da média do extravasamento de azul de Evans; b – Administrado pela via i.p., 30 min antes; c – Administrado pela via oral, 30 min antes; d- Administrado pela via intrapleural, 30 min antes. Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6-10 animais por grupo). As diferenças estatísticas entre o grupo controle (animais tratados com carragenina) e os animais tratados (30 min antes) com as diferentes drogas e posteriormente com a carragenina foram determinadas através do teste de ANOVA, e complementados com teste de Dunnett e estão representadas pelos símbolos: † P < 0,05 and ‡ P < 0,01.

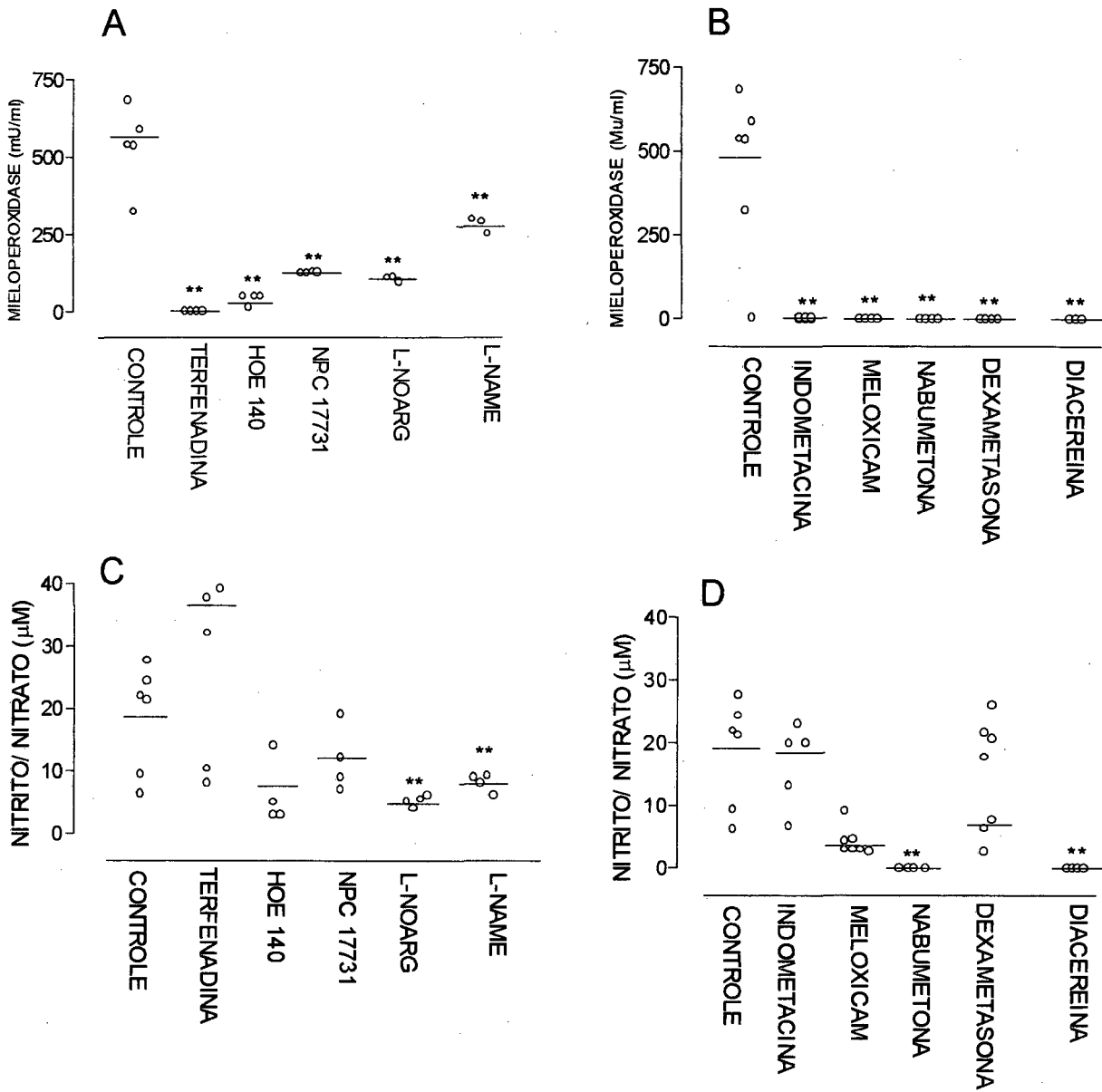


Figura 4- Efeito de diferentes drogas sobre os níveis da mieloperoxidase (A e B) e do nitrito/nitrato (C e D) na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos. Controle = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). Os símbolos indicam valores individuais, e as linhas horizontais, os valores da mediana (** P < 0,01).

Tabela 5- Efeito do tratamento prévio de animais com várias drogas na segunda fase (48 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos

Grupo	Leucócitos (x 10 ⁶)	Neutrófilos (x 10 ⁶)	Mononucleares (x 10 ⁶)	Exsudato ^a (µg/ml)
Salina ^d	1,3±0,2	0,2±0,3	1,1±0,7	0,02±0,1
Carragenina ^d	10,2±0,9	0,8±0,5	9,4±0,8	10,4±0,7
Terfenadina ^b (50 mg/kg)	8,7±0,1	0,4±0,1‡	8,3±0,7	7,0±0,7‡
Indometacina ^b (5 mg/kg)	9,5±0,03	2,3±0,5‡	7,2±0,2	10,0±0,5
Meloxicam ^c (5 mg/kg)	9,7±0,2	0,3±0,2	9,4±0,3	9,0±0,5
Nabumetona ^c (50 mg/kg)	8,5±1,0	4,3±0,5‡	4,2±0,9	13,8±1,0
Diacereína ^c (50 mg/kg)	5,6±0,9‡	3,6±0,2‡	3,0±0,5‡	8,1±1,2
Dexamatasona ^b (0,5 mg/kg)	4,3±0,2‡	0,1±0,1	4,2±0,3‡	9,6±0,6
HOE 140 ^d (1 pmol)	8,5±0,05	0,5±0,1‡	8,0±0,8	9,0±0,1
NPC 17731 ^d (1 pmol)	8,3±0,8	0,4±0,2‡	7,9±0,5	9,2±0,7

Os parâmetros foram analisados 48 h após a administração da carragenina ou da salina estéril (0,9%) na cavidade pleural de camundongos. a – Avaliado através da média do extravasamento de azul de Evans; b – Administrado pela via i.p., 30 min antes; c – Administrado pela via oral, 30 min antes; d- Administrado pela via intrapleural, 30 min antes. Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6-10 animais por grupo). As diferenças estatísticas entre o grupo controle (animais tratados com carragenina) e os animais tratados (30 min antes) com as diferentes drogas e posteriormente com a carragenina foram determinadas através do teste de ANOVA, complementados com teste de Dunnett e representadas pelos símbolos: † P < 0,05 and ‡ P < 0,01.

4.1.2 Evidências da participação do receptor B₂ da bradicinina

As Figuras 5 e 6 mostram o efeito de antagonistas seletivos do receptor B₂ da bradicinina (NPC 17731 e HOE 140) na pleurisia induzida pela carragenina 1% (4 h). O NPC 17731, nas doses de 1 a 10 pmol/cav., 30 min antes, promoveu inibição significativa tanto da migração celular como da exsudação (P < 0,01) (Figura 5A). O valor médio da DI₅₀ foi de 0,7 (95% LC = 0,18-2,17) pmol/cav. Este antagonista (1 pmol/cav.), administrado 4 a 48 h antes, inibiu todos os parâmetros inflamatórios estudados (migração celular e exsudação) (Figura 5B). Já a administração do NPC 17731 (1 pmol/cav., 30 min antes), só foi efetivo em inibir a exsudação (P < 0,01) (Figura 5B).

O outro antagonista seletivo do receptor B₂ para a bradicinina, o HOE 140 (0,003-10 pmol/cav., 30 min antes), também foi efetivo em inibir tanto a migração celular como a exsudação (P < 0,01) (Figura 6A). O valor médio da DI₅₀ foi de: 0,002 (95% limite de confiança (LC) = 0,0011-4,8) pmol/cav. O efeito inibitório desse antagonista foi prolongado, uma vez que, na dose de 1 pmol/cav., (30 min a 24 h antes), os parâmetros estudados foram inibidos (P < 0,01) (Figura 6B).

A participação do receptor B₂ da bradicinina, neste modelo experimental, foi também avaliada com o emprego de um novo antagonista não-peptídico do receptor B₂ da bradicinina, o NPC 18884, administrado pelas vias oral e intraperitoneal. Os efeitos do NPC 18884 (1-300 nmol/kg, i.p.), na primeira fase da reação inflamatória (4 h) induzida pela carragenina são mostrados na Figura 7.

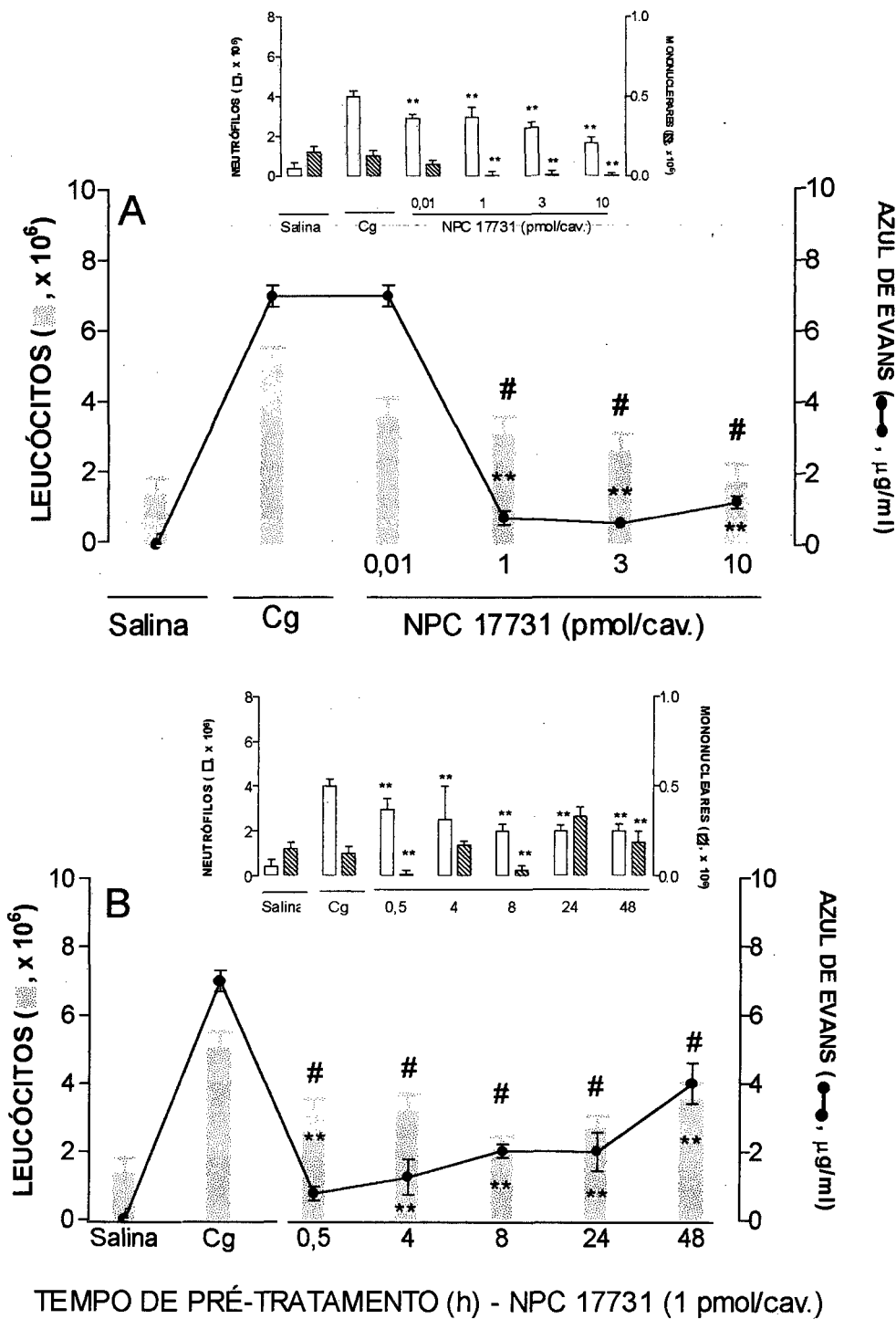
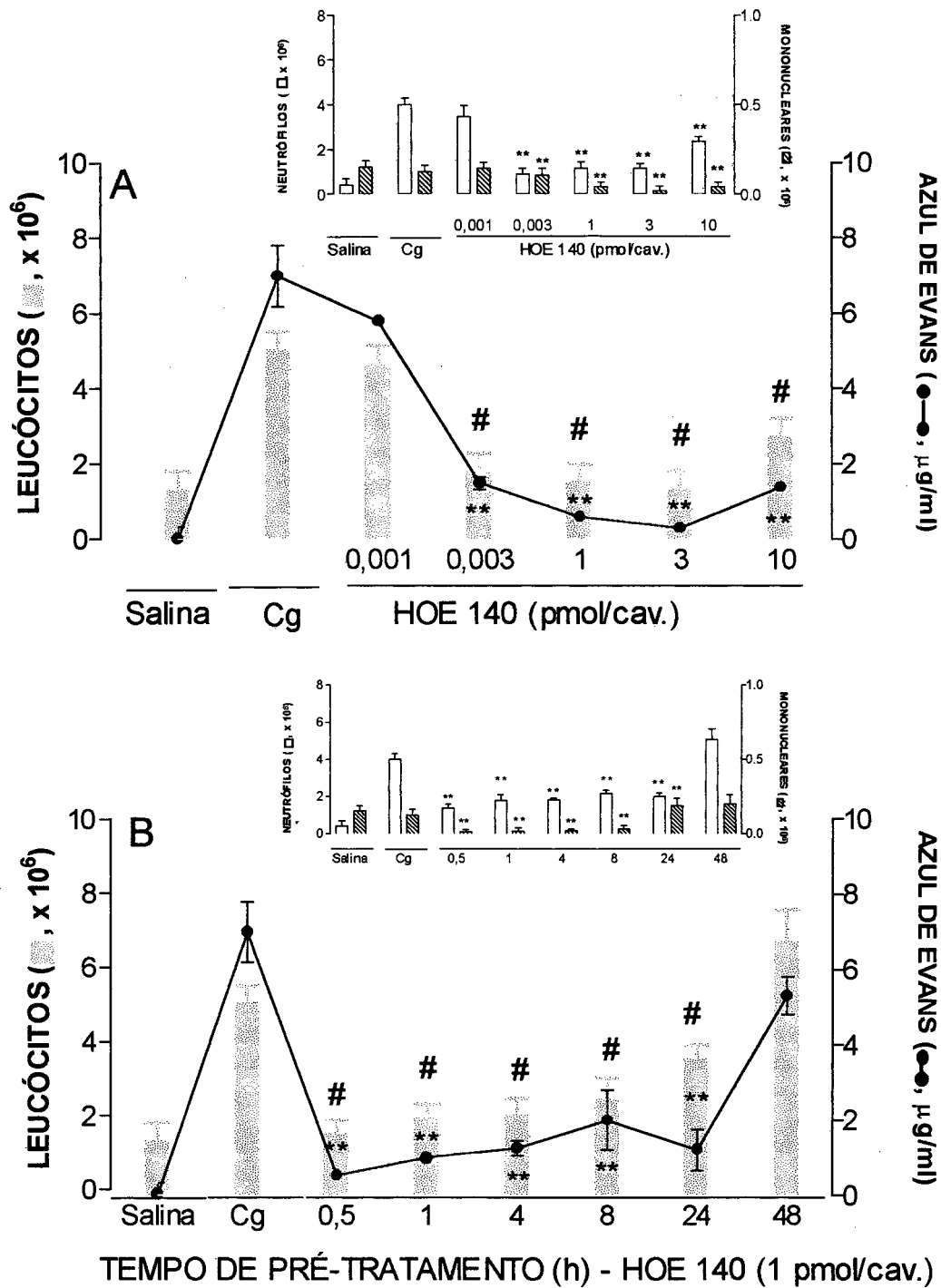


Figura 5- Efeito do NPC 17731 sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do NPC 17731 (0,01-10 pmol/cav.), administradas 30 min antes da carragenina. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%, 4 h). B- Efeito do NPC 17731 (1 pmol/cav.), administrado de 30 min a 48 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.



gura 6- Efeito do HOE 140 sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do HOE 140 (0,001-10 pmol/cav.), administradas 30 min antes da carragenina. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%, 4 h). B- Efeito do HOE 140 (1 pmol/cav.), administrado de 30 min a 48 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m se sobrepuseram ao desenho das colunas.

Doses desse antagonista entre 100 e 300 nmol/kg, i.p., inibiram, de forma significativa, a migração celular, às custas de neutrófilos ($P < 0,01$). O efeito inibitório foi dose-dependente, com valor médio da DI_{50} de 132 (95% LC = 63-278) nmol/kg. Além disso, o NPC 18884 (10-300 nmol/kg, i.p.), causou também redução significativa da exsudação ($P < 0,01$) (Figura 7A). Quando os animais foram tratados previamente (30 min a 4 h) com o NPC 18884 (300 nmol/kg, i.p.), observou-se efeito inibitório significativo da exsudação, 4 h após a administração da carragenina ($P < 0,01$) (Figura 7B). Destaca-se também que o número total de células foi significativamente reduzido quando os animais foram tratados 30 min antes da indução da pleurisia ($P < 0,01$) (Figura 7B).

Administrado por via oral, o NPC 18884 (600-1200 nmol/kg, 30 min antes) inibiu tanto a migração celular como a exsudação ($P < 0,01$) (Figura 8A). O valor médio da DI_{50} para esse antagonista foi de 295 (95% LC = 117-730) nmol/kg. A dose de 300 nmol/kg, administrada pela via oral foi efetiva em inibir apenas a exsudação ($P < 0,01$). O NPC 18884 (1200 nmol/kg, v.o., 30 min-4 h antes da carragenina) causou redução significativa da exsudação ($P < 0,01$) (Figura 8B). Na mesma condição, a migração celular foi reduzida somente nos animais tratados previamente (30 min) com a mesma dose desse antagonista ($P < 0,01$) (Figura 8B).

A seletividade do NPC 18884 para o receptor B_2 da bradicinina foi também avaliada na pleurisia induzida por esta cinina (SALEH et al., 1997), pela desArg⁹-BK (VIANNA e CALIXTO, 1998), pela histamina e pela substância P (SALEH et al., 1999).

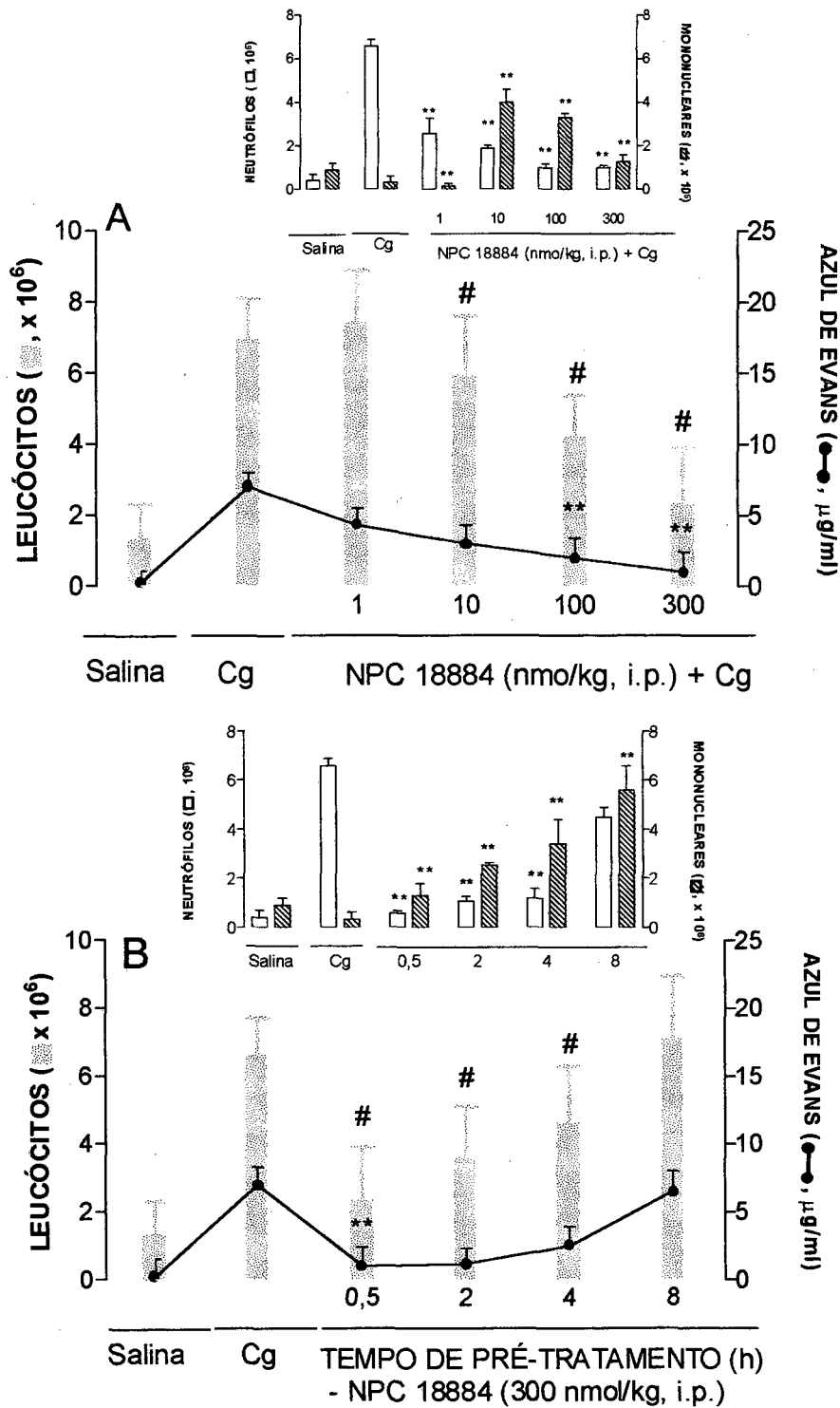


Figura 7- Efeito do NPC 18884 sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do NPC 18884 (1-300 nmol/kg, i.p.), administradas 30 min antes da carragenina. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%, 4 h). B- Efeito do NPC 18884 (300 nmol/kg, i.p.), administrado de 30 min a 8 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

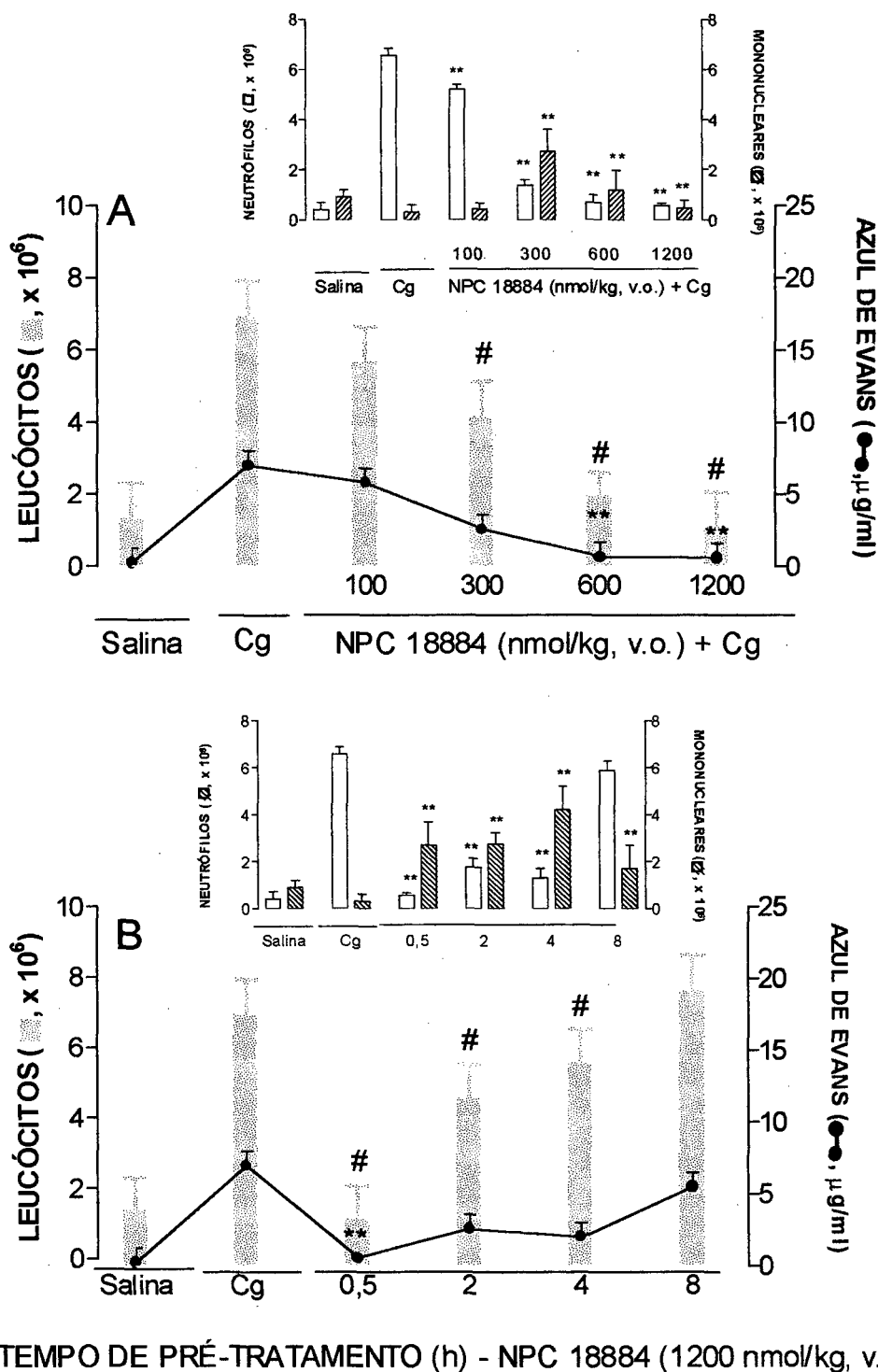


Figura 8- Efeito do NPC 18884 sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do NPC 18884 (100-1200 nmol/kg, v.o.), administradas 30 min antes da carragenina. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%, 4 h). B- Efeito do NPC 18884 (1200 nmol/kg, v.o.), administrado de 30 min a 8 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos da droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

Na pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav.), o NPC 18884 (30 e 100 nmol/kg, 30 min antes, i.p.), causou redução significativa da exsudação (controle BK: 10 nmol/cav. : $0,64 \pm 0,07$ $\mu\text{g/ml}$, NPC 18884: 30 nmol/kg: $0,30 \pm 0,7$ $\mu\text{g/ml}$ e 100 mg/kg: $0,37 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) ($P < 0,01$). O perfil temporal inibitório (30 min a 4 h) deste antagonista foi também avaliado, sendo que a dose de 100 nmol/kg, i.p., (30 min e 2 h) inibiu de forma significativa a exsudação (42 ± 1 e $30 \pm 1\%$, respectivamente) (resultados não mostrados). Em relação à migração celular, o NPC 18884 (30-100 nmol/kg, i.p., 30 min antes) também causou inibição significativa deste parâmetro ($P < 0,01$) (Figura 9A). Neste experimento, o valor médio estimado da DI_{50} para esse antagonista foi de 63 (3-115) nmol/kg. Além disso, neste modelo experimental, o NPC 18884 (100 nmol/kg, i.p.) causou efeito inibitório da migração celular quando foi administrado nos intervalos de 30 min a 2 h antes da bradicinina (Figura 9B).

Por via oral, o NPC 18884 (300 e 600 nmol/kg, v.o., 30 min antes.) inibiu a exsudação induzida pela bradicinina (% de inibição: $38 \pm 0,9$ e $47 \pm 0,5\%$, respectivamente; $n = 6$ a 10 animais por grupo) ($P < 0,01$). Este mesmo antagonista (600 nmol/kg), administrado (30 min a 2 h antes) causou também redução significativa da exsudação (% de inibição: $47 \pm 0,4$ e $35 \pm 0,8\%$, respectivamente) ($P < 0,01$). Em relação à migração celular, o NPC 18884 (300-600 nmol/kg, 30 min antes) causou inibição significativa deste parâmetro (Figura 10A). Neste protocolo experimental, o valor médio da DI_{50} para este antagonista foi de: 141 (95% LC = 26-760) nmol/kg). Além disso, o NPC 18884 (600 nmol/kg,

30 min a 2 h antes) foi efetivo em inibir o influxo de leucócitos induzido pela bradicinina (10 nmol/cav., 4 h) (Figura 10B).

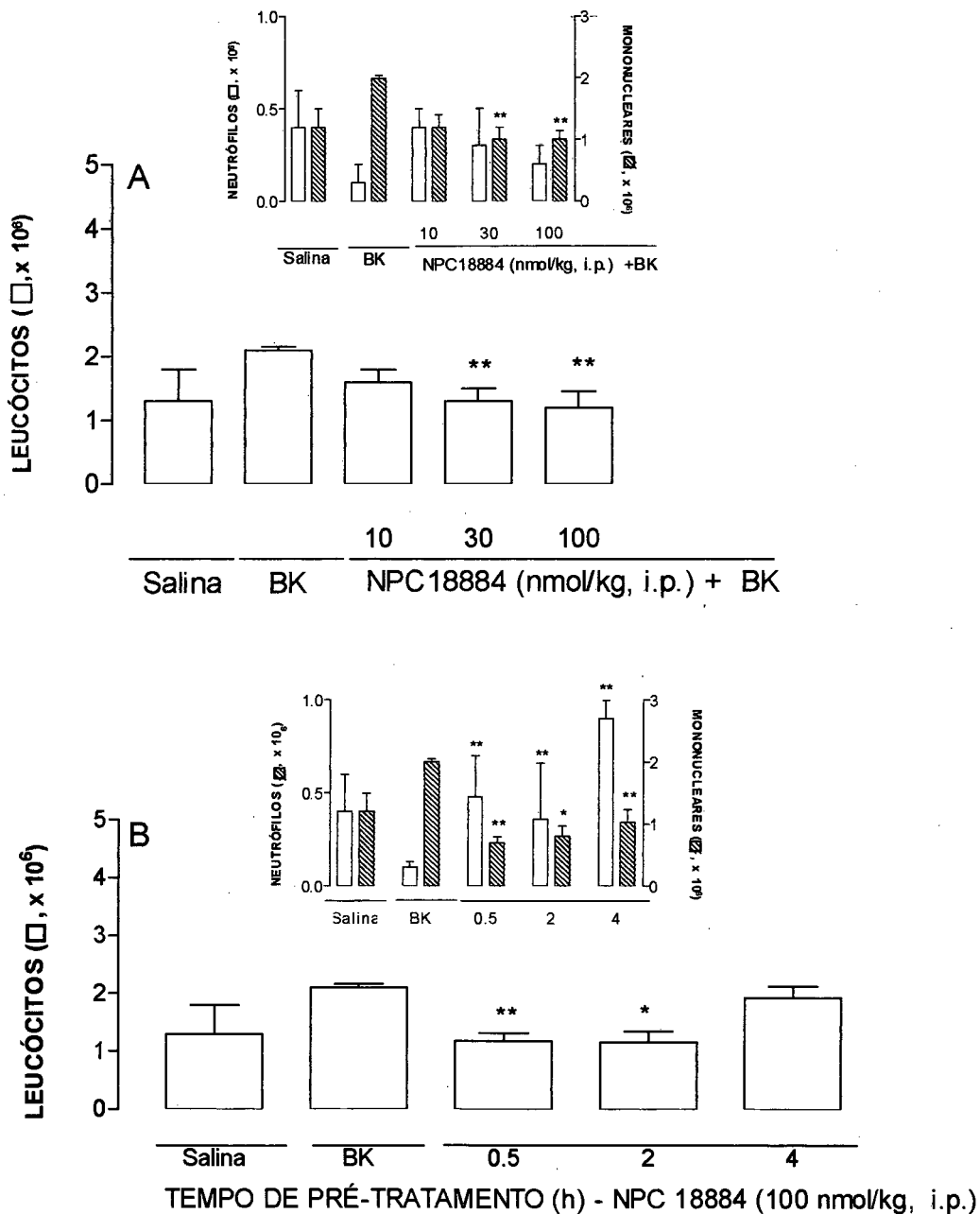


Figura 9- Efeito do NPC 18884 sobre a migração celular na pleurisia induzida pela bradicinina (10 nmol/cav.) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do NPC 18884 (10-100 nmol/kg, i.p.), administradas 30 min antes da bradicinina. BK = respostas obtidas de animais tratados com bradicinina (BK 10 nmol/kg 4 h). B- Efeito do NPC 18884 (100 nmol/kg, i.p.), administrado de 30 min a 4 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos da droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos indicam as diferenças estatísticas (P < 0,05) entre o total de células, em relação aos respectivos controles (BK).

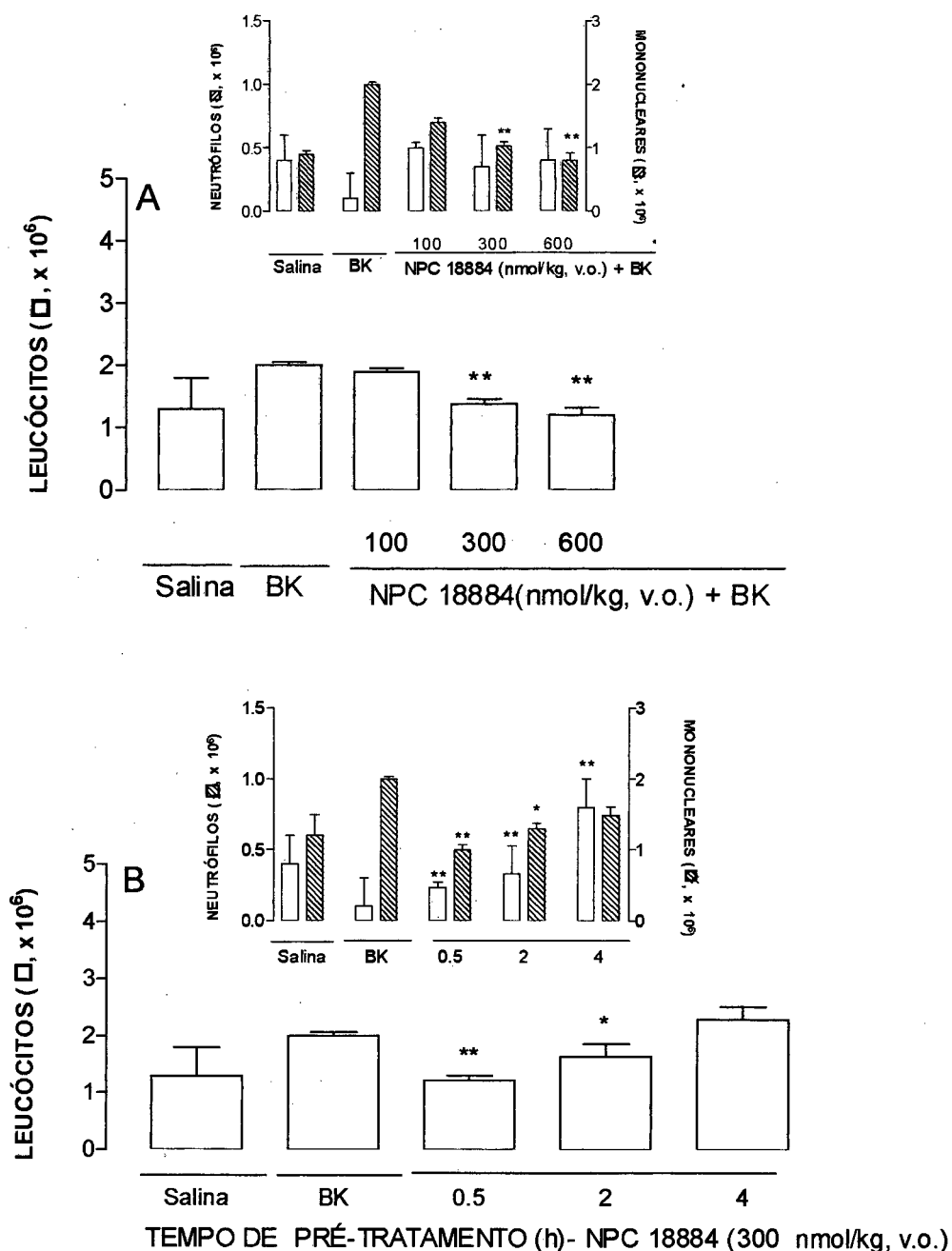


Figura 10- Efeito do NPC 18884 sobre a migração celular na pleurisia induzida pela bradycinin (10 nmol/kg.) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do NPC 18884 (100-600 nmol/kg, v.o.), administradas 30 min antes da bradycinin. BK = respostas obtidas de animais tratados com bradycinin (BK 10 nmol/cav. 4 h). B- Efeito do NPC 18884 (300 nmol/kg, v.o.), administrado de 30 min a 4 h antes da pleurisia, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos da droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada coluna e símbolo representam a média dos resultados obtidos de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos indicam as diferenças estatísticas (P < 0,05) entre o total de células, em relação aos respectivos controles (BK).

A seletividade do antagonista não-peptídico para o receptor B₂ da BK foi também avaliado. O NPC 18884 (100 nmol/kg, i.p. ou 600 nmol/kg, v.o.) administrado 30 min antes do agente flogístico não foi efetivo em inibir a migração celular e a exsudação no modelo da pleurisia induzida pela des-Arg⁹-BK (30 nmol/cav., 1 e 4 h). Além disso, O NPC 18884 (1200 nmol/kg, v.o., 30 min antes) também não foi eficaz em inibir a resposta inflamatória induzida pela histamina (0,9 nmol/cav., 4 h) e pela substância P (20 nmol/cav., 4 h), em camundongos (resultados não mostrados).

4.1.3 Evidências da participação de citocinas (TNF α , iL-1 β , IL-6, iL-8, IL-10) em ambas as fases (4 e 48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina

A Figura 11 mostra o efeito do TNF α na primeira (4 h) e na segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina (1%), em camundongos. Doses variando entre 0,001 a 5 ng/cav. de TNF α , 5 min antes da carragenina, causaram aumento significativo da exsudação 4 h após a indução da pleurisia (P < 0,01) (Figura 11A). Nas mesmas condições experimentais, esta citocina causou diminuição do número de leucócitos, principalmente às custas de neutrófilos na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (P < 0,01) (Figura 11A e Figura 11A *insert*). Em relação à segunda fase (48 h) dessa resposta inflamatória, o TNF α (50 ng/cav., 5 min antes do agente irritante) causou aumento significativo tanto da migração celular, às custas de polimorfonucleares, como da exsudação (P < 0,01) (Figura 11B e Figura 11B *insert*). Além disso, doses entre 0,01 a 5

ng/cav. do $TNF\alpha$ causaram aumento somente da exsudação ($P < 0,01$) (Figura 11B).

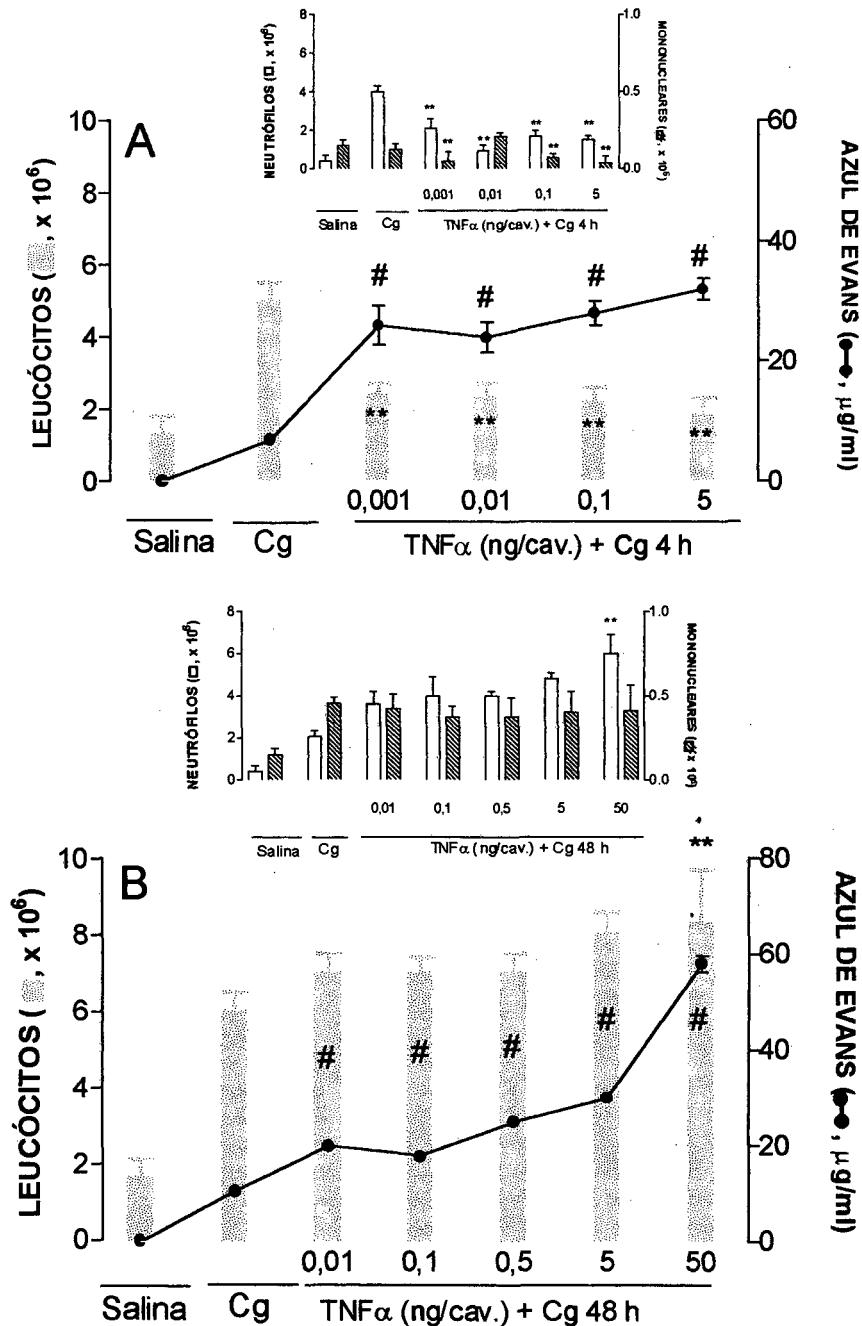


Figura 11- Efeito do $TNF\alpha$ sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do $TNF\alpha$ (0,001-5 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%). B- Efeito de diferentes doses do $TNF\alpha$ (0,01-50 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

Os efeitos da injeção intrapleural do anticorpo anti-TNF α , tanto na primeira (4 h) quanto na segunda (48 h) fases da resposta inflamatória são mostrados na Figura 12. O anticorpo anti-TNF α (5-50 ng/cav., 30 min antes do irritante) produziu diminuição significativa da migração celular e da exsudação causada pela carragenina, de forma independente da dose ($P < 0,01$) (Figura 12A). A resposta inflamatória tardia (48 h) induzida pela carragenina não foi inibida pelo anticorpo anti-TNF α (5- 100 ng/cav., 30 min antes) (Figura 12B).

Os resultados da Figura 13A mostram que a injeção intrapleural de IL-1 β (5-50 ng/cav., 5 min antes), causou aumento significativo da exsudação 4 h após a injeção da carragenina ($P < 0,01$), enquanto que a migração celular foi significativamente reduzida ($P < 0,05$) (Figura 13A, *insert*). Em relação a segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, a IL-1 β (0,05 ng/cav., 5 min antes), causou aumento significativo de ambos os parâmetros inflamatórios ($P < 0,01$) (Figura 13B, *insert*). A mesma citocina, na dose de 0,01 ng/cav., causou somente aumento significativo da exsudação associado com diminuição da migração celular ($P < 0,01$) (Figura 13A). O anticorpo policlonal anti-IL-1 β (5-100 ng/cav., 30 min antes) causou somente diminuição da migração celular na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina ($P < 0,05$) (Figura 14A). A exsudação foi inibida apenas com a dose de 100 ng/cav. deste agente ($P < 0,01$). Por outro lado, o anticorpo anti-IL-1 β (5-50 ng/cav., 30 min antes) aumentou tanto a migração celular como a exsudação da resposta inflamatória tardia (48 h) induzida pela carragenina ($P < 0,05$) (Figura 14B). Já a dose de 100 ng/cav. desse anticorpo,

nestas condições, promoveu aumento somente da exsudação (P < 0,01) (Figura 14B).

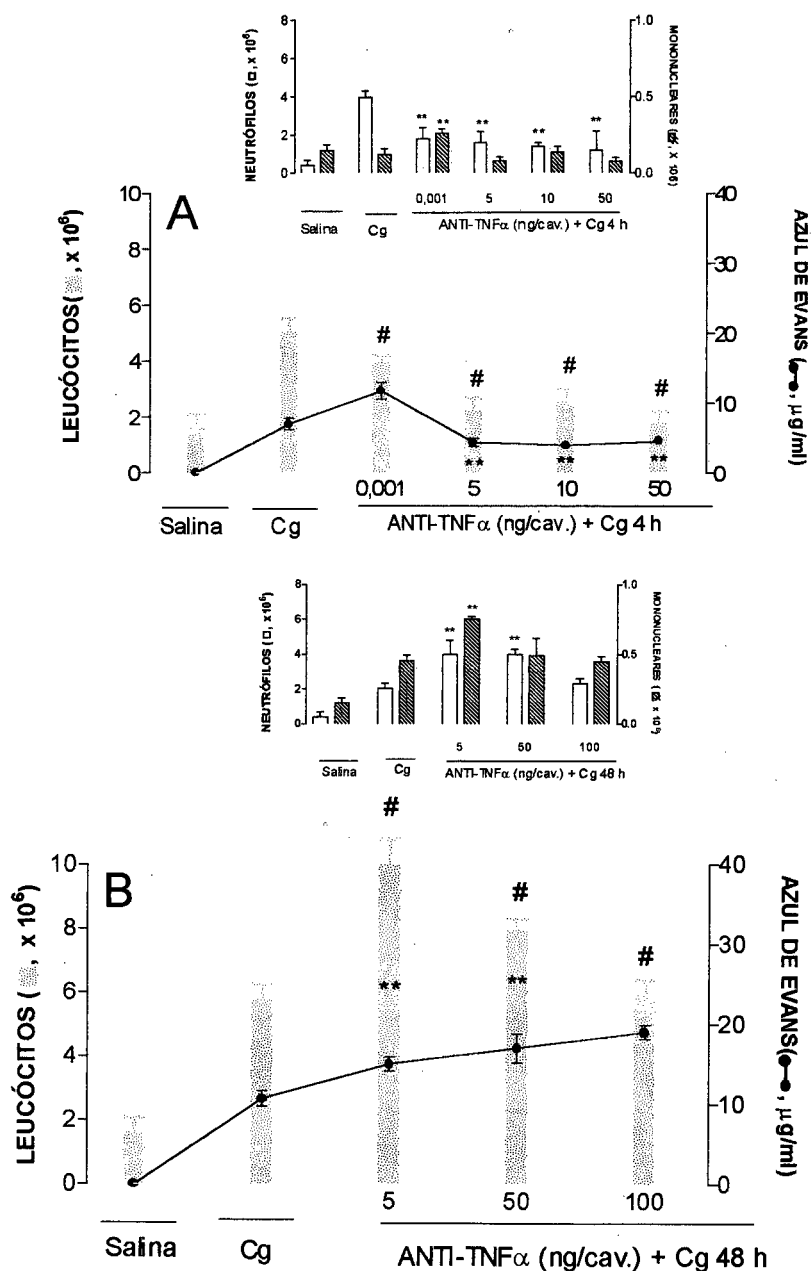


Figura 12- Efeito do anti-TNF α sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do anti-TNF α (0,001-50 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses do anti-TNF α (5-50 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

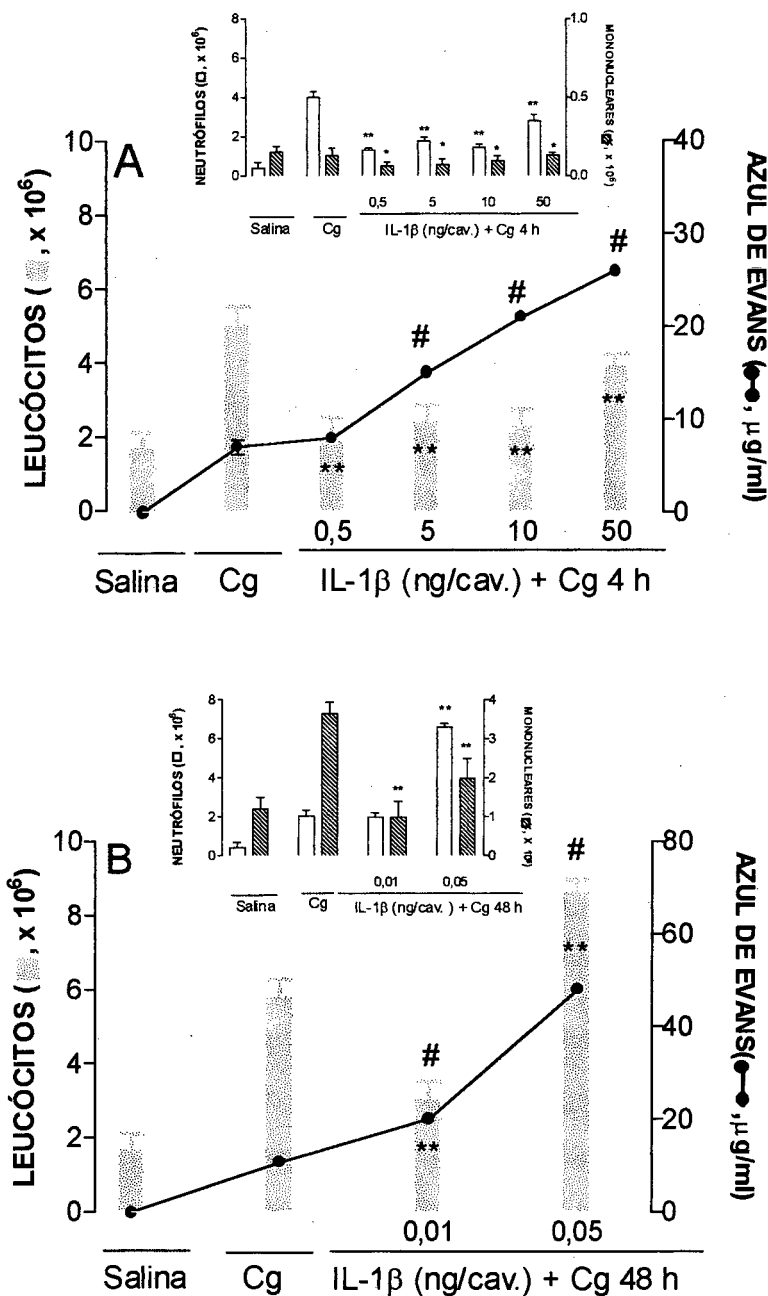


Figura 13- Efeito da IL-1β sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da IL-1β (0,5-50 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses da IL-1β (0,01-0,05 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,05; P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

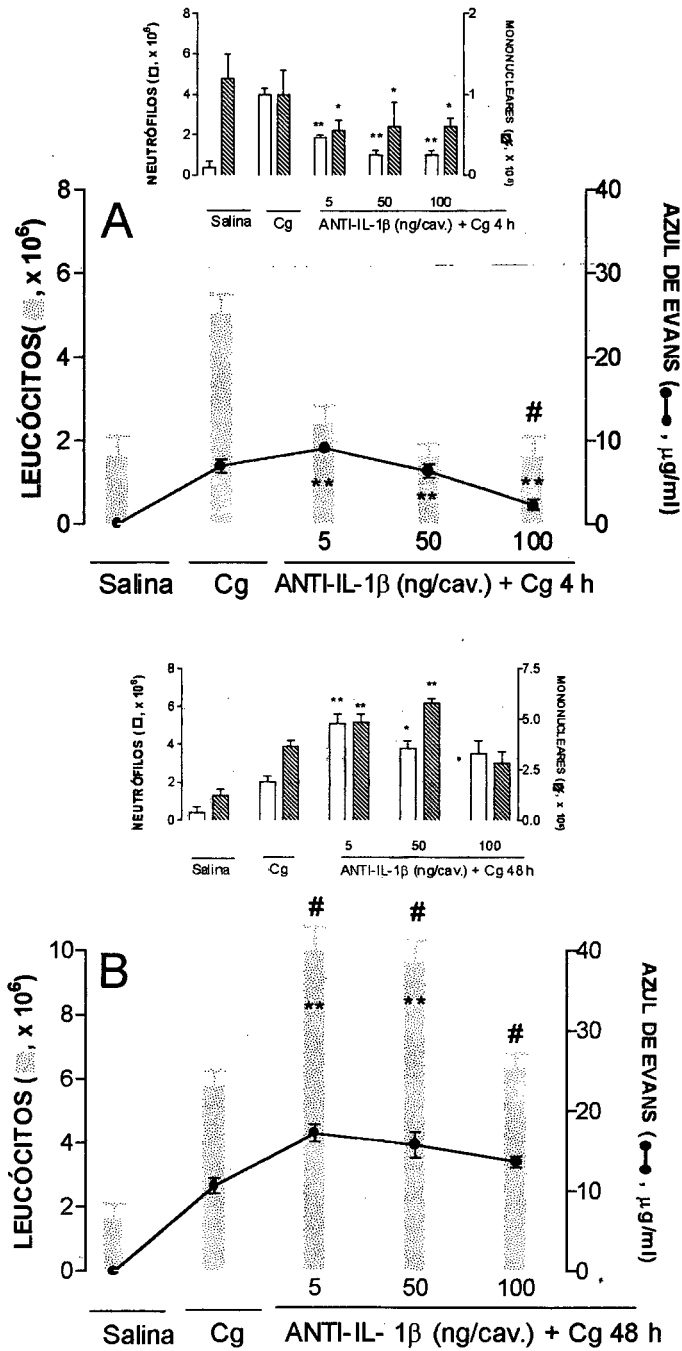


Figura 14- Efeito do anti-IL-1β sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da anti-IL-1β (5-100 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses do anti-IL-1β (5-100 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,05; P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

O tratamento dos animais com antagonista natural do receptor da IL-1 (IL1-RA: 5-10 $\mu\text{g}/\text{cav.}$, 30 min antes) suprimiu a migração de neutrófilos bem como a exsudação ($P < 0,01$) da primeira fase (4 h) da resposta inflamatória (Figura 15A). O IL1-RA (75-100 $\mu\text{g}/\text{cav.}$, 30 min antes) ainda foi efetivo, agindo de forma antiinflamatória na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina. É importante ressaltar que a dose de 50 ng/cav. desse antagonista causou apenas aumento da exsudação ($P < 0,01$) (Figura 15B).

Para avaliar a participação de quemocinas neste modelo experimental, alíquotas do lavado pleural foram obtidos de animais tratados previamente com IL-8 (25-100 ng/cav., 5 min antes). Nestas condições, observou-se aumento tanto da migração celular como da exsudação, na primeira fase (4 h) de forma dose-dependente ($P < 0,01$) (Figura 16A). Em relação à segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, a IL-8 (100 ng/cav., 30 min antes) promoveu aumento da exsudação ($P < 0,01$) (Figura 16B), enquanto doses de 10 a 50 ng/cav. não modificaram a resposta inflamatória induzida pela carragenina.

Nas mesmas condições experimentais, o anticorpo anti-IL-8 (5-100 ng/cav., 30 min antes) inibiu o processo inflamatório da primeira fase (4 h) ($P < 0,01$) (Figura 17A, *insert*). O valor médio da DI_{50} foi de 53,5 (95% LC = 37,9-69,8) ng/cav. Os parâmetros estudados 48 h após a indução da pleurisia, não foram modificados com o tratamento prévio (30 min) dos animais com anticorpo anti-IL-8 (Figura 17B).

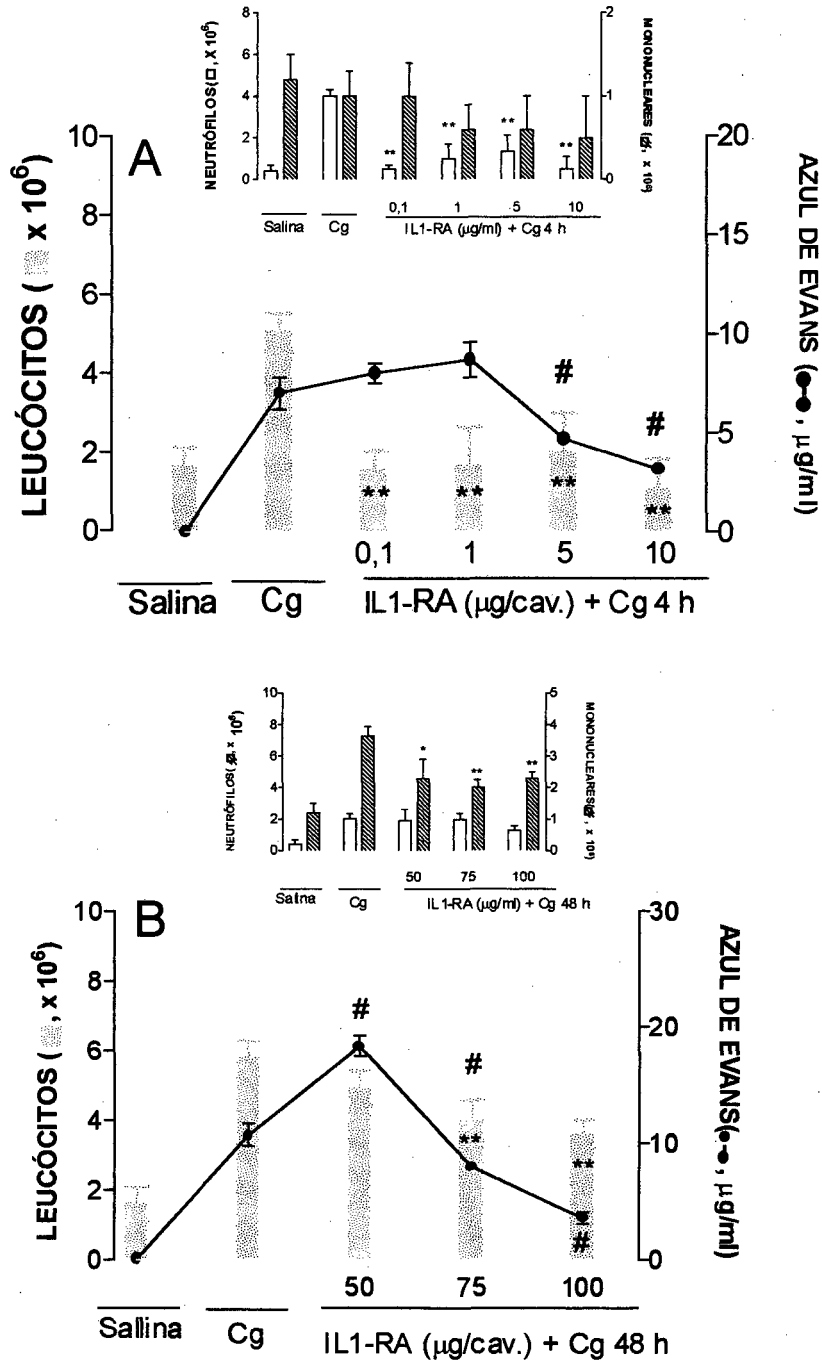


Figura 15- Efeito do IL1-RA sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do IL1-RA (0,1-10 mg/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses do IL1-RA (50-100 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,05$; $P < 0,01$) entre o total de células (**), e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

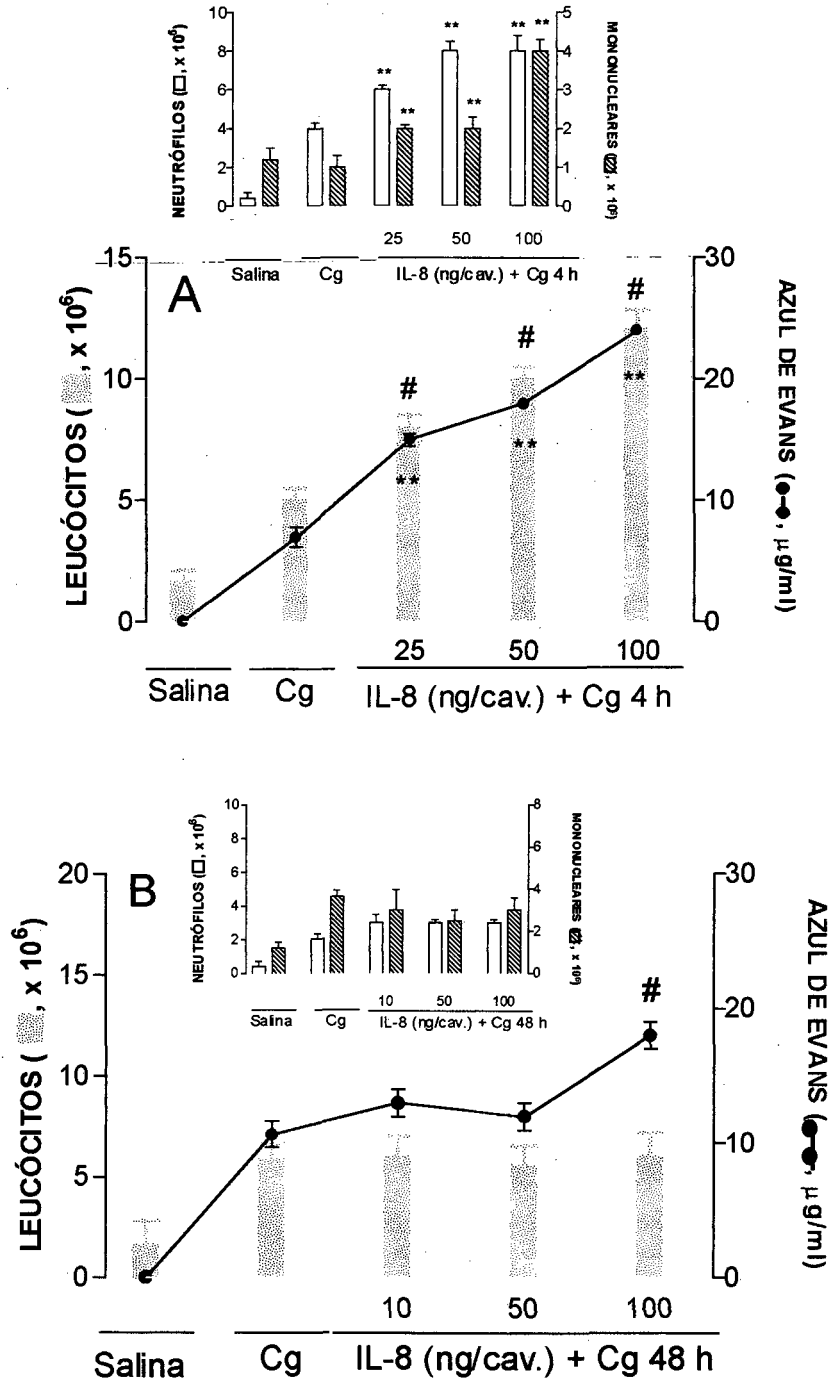


Figura 16- Efeito da IL-8 sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da IL-8 (25-100 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses da IL-8 (10-100 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

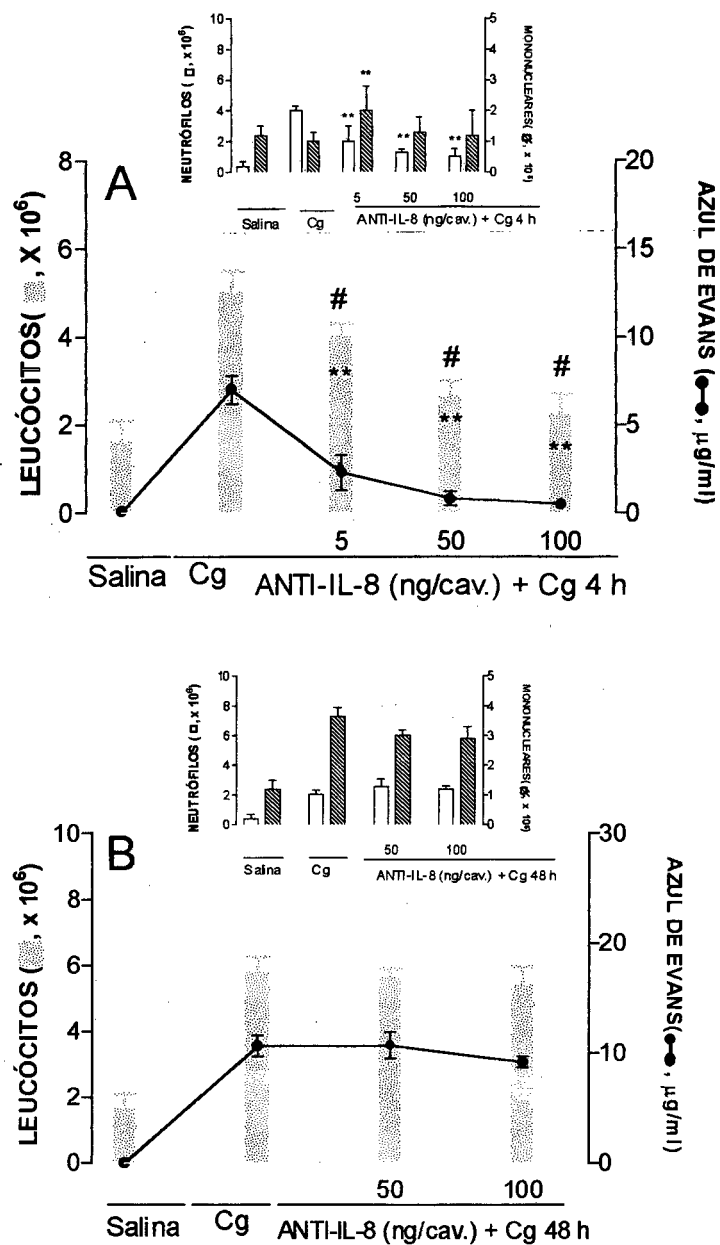


Figura 17- Efeito do anti-IL-8 sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da anti-IL-8 (5-100 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses da anti-IL-8 (50-100 ng/cav.), administradas 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais, o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

A IL-6 (50 ng/cav., 5 min antes) promoveu diminuição significativa tanto da migração celular, quanto da exsudação (4 h) ($P < 0,01$) (Figura 18A). Doses de 5 a 10 ng/cav., 5 min antes, foram efetivas em inibir apenas a migração celular ($P < 0,01$). Em relação à segunda fase (48 h), a IL-6 (5-100 ng/cav., 5 min antes), inibiu de maneira significativa tanto a migração celular, quanto à exsudação ($P < 0,01$) (Figura 18B).

Por sua vez, o anticorpo anti-IL-6 (0,001-50 ng/cav., 30 min antes), aumentou a exsudação da primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina ($P < 0,01$) (Figura 19A). Estas mesmas doses utilizadas promoveram também diminuição da celularidade ($P < 0,01$) Figura 19, *insert*). Doses de 50 ng/cav., 30 min antes, promoveram aumento tanto da exsudação quanto da migração celular na segunda fase (48 h) da pleurisia ($P < 0,01$) (Figura 19B), enquanto que neste período de tempo, esta citocina na dose de 5 ng/cav., apenas aumentou a exsudação (Figura 19B).

A IL-10 (5-40 ng/cav., 5 min antes), promoveu diminuição dos parâmetros inflamatórios analisados ($P < 0,01$) (Figura 20A, *insert*). Em relação à resposta inflamatória induzida pela carragenina (48 h), verificamos que esta citocina (40 ng/cav.) não alterou nem a exsudação nem a migração celular (Figura 20B, *insert*).

É importante ressaltar que as diferentes doses das citocinas-recombinantes ou dos anticorpos-policlonais utilizados, foram administrados isoladamente em diferentes grupos de animais e os resultados mostraram que tanto o uso isolado das citocinas como dos anticorpos estudados não induziram resposta inflamatória na cavidade pleural dos camundongos.

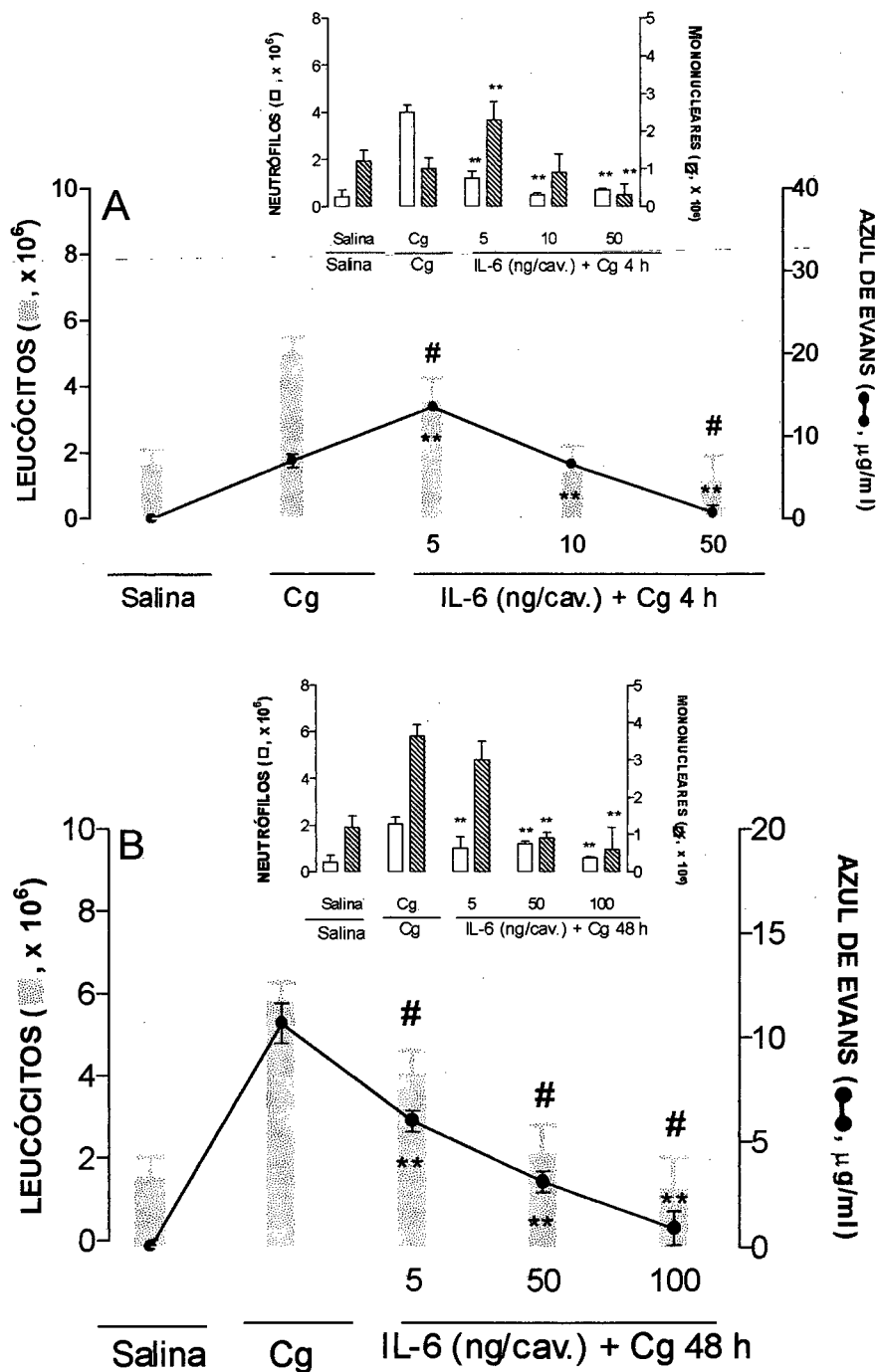
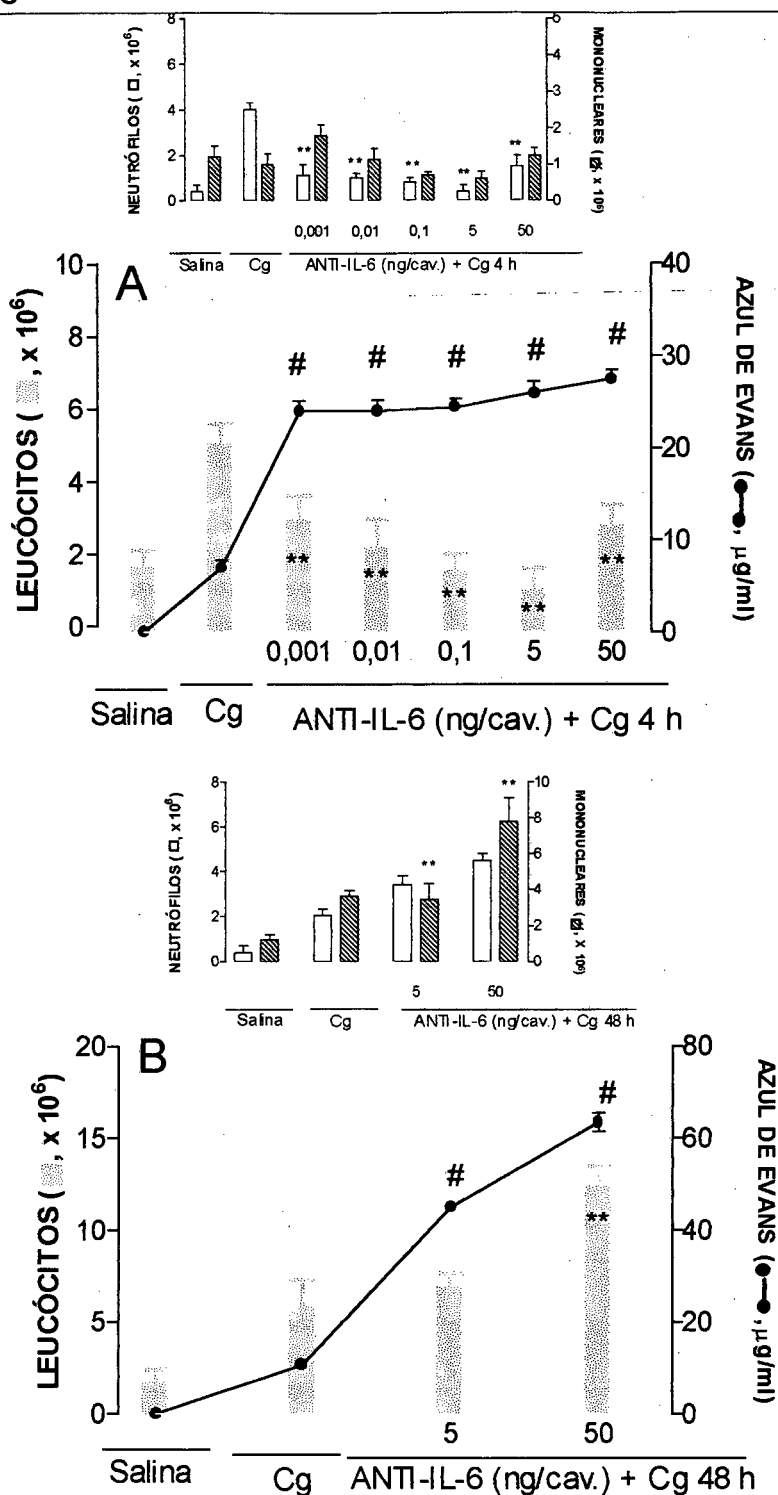


Figura 18- Efeito da IL-6 sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%), em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da IL-6 (5-50 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses da IL-6 (5-100 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.



gura 19- Efeito do anti-IL-6 sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%), em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da anti-IL-6 (0,001-50 ng/cav.), administrado 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidos de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito de diferentes doses da anti-IL-6 (5-50ng/cav.) administradas, 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

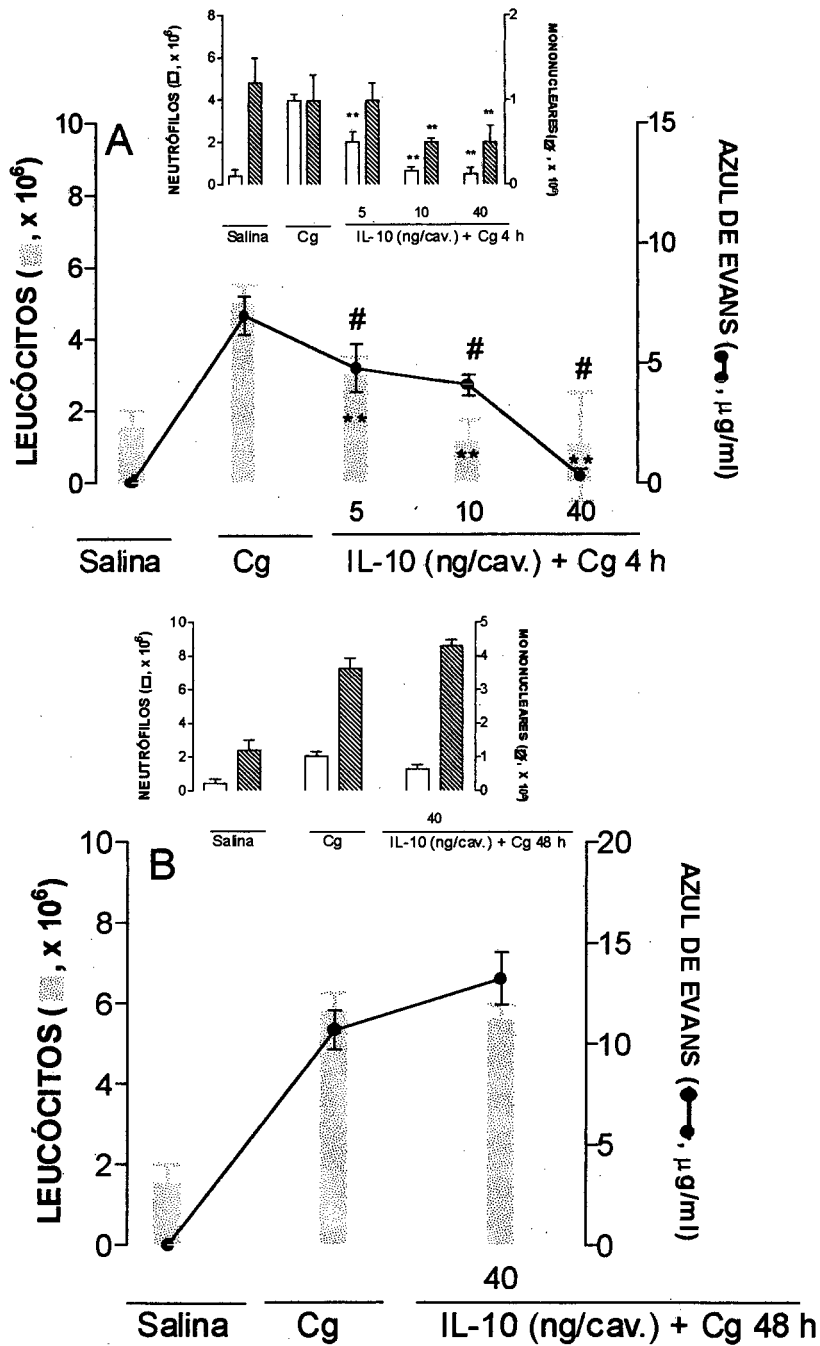


Figura 20 -Efeito da IL-10 sobre a migração celular e a exsudação na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da IL-10 (5-40 ng/cav.), administradas 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 4 h. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito da IL-10 (40 ng/cav.), administrada 5 min antes da pleurisia induzida pela carragenina, 48 h, na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

4.1.4 Evidências da participação do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B

A-) Análise do efeito de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (PDTC e sulfasalazina),

A Figura 21 mostra o efeito do PDTC na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

O PDTC (100-200 mg/kg., i.p., 60 min antes) causou inibição significativa tanto da exsudação, quanto da migração celular causada pela carragenina ($P < 0,01$) (Figura 21A). O valor médio da DI_{50} foi de 76 (95% LC = 4-162) mg/kg. O perfil inibitório temporal (5-120 min) do PDTC (100 mg/kg, i.p.), mostrou que este agente foi efetivo em inibir os parâmetros inflamatórios apenas quando administrado 60 e 120 min antes do agente flogístico ($P < 0,01$) (Figura 21B, *insert*). Em relação à segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, o PDTC (100-200 mg/kg, i.p., 60 min antes não inibiu os parâmetros inflamatórios estudados (resultados não apresentados).

O efeito de outro inibidor do fator de transcrição nuclear NF- κ B - sulfasalazina - foi também avaliado neste modelo experimental. A sulfasalazina (50-300 mg/kg, 60 min antes, i.p.), inibiu os parâmetros inflamatórios (migração celular e exsudação 4 h após a indução da pleurisia ($P < 0,01$) (Figura 22A). O valor médio da DI_{50} foi de 100 (95% LC = 79-135) mg/kg. Análise do perfil inibitório temporal (5-120 min) antes da pleurisia foi também avaliado, mostrando que este agente (200 mg/kg, i.p.) inibiu a migração celular e a exsudação quando administrada de 30 a 120 min, antes da carragenina ($P < 0,01$) (Figura 22B). Em relação à segunda fase (48 h) da resposta à carragenina, a sulfasalazina (200-

300 mg/kg, i.p., 60 min antes), não foi capaz de inibir nem a migração celular nem a exsudação (resultados não apresentados).

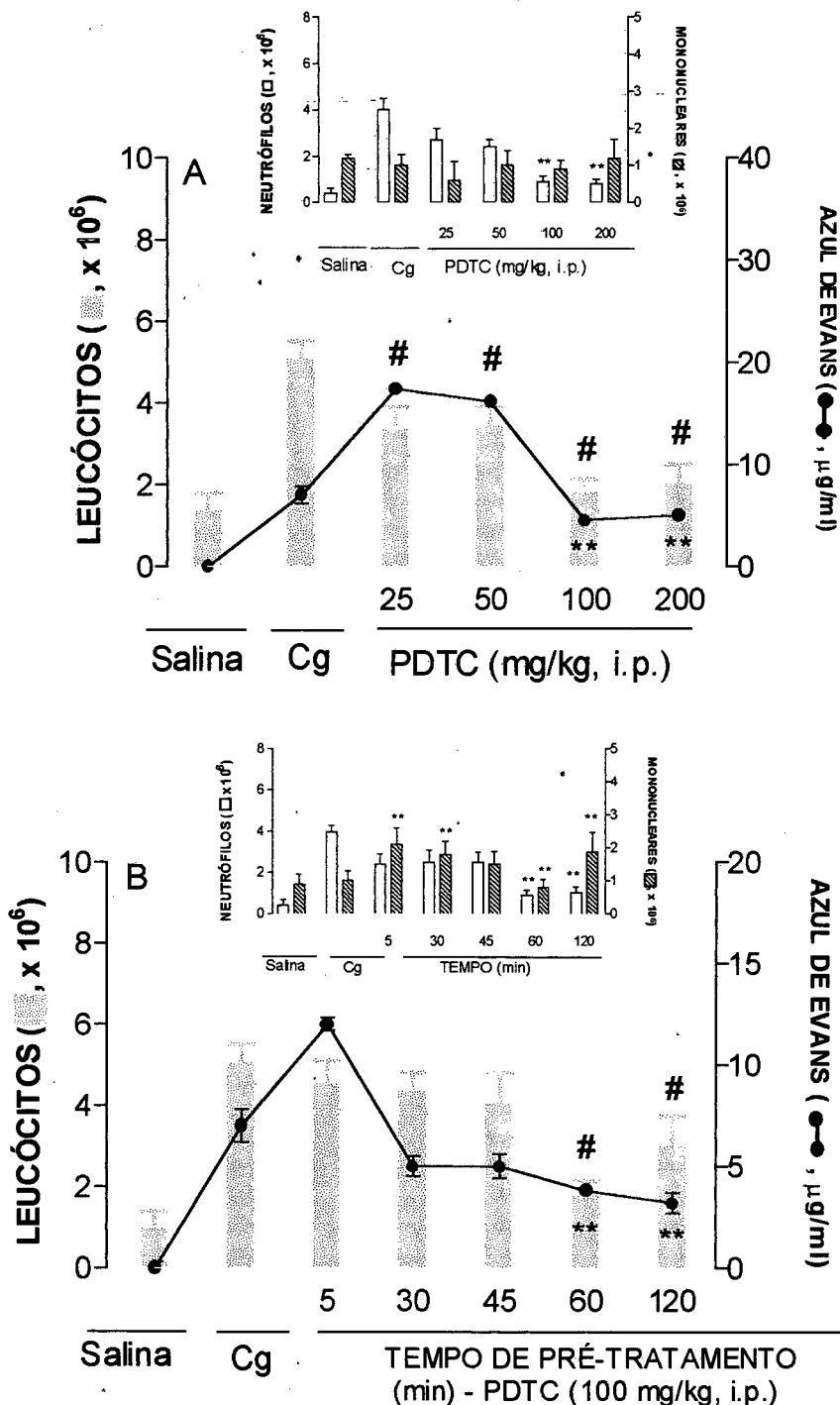


Figura 21- Efeito do PDTC sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A- Efeito de diferentes doses do PDTC (25-200 mg/kg, i.p.), administradas 60 min antes da pleurisia. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (Cg 1%). B- Efeito do PDTC (100 mg/kg, i.p.), administrado de 5 a 120 min antes da pleurisia na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos desta droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas (P < 0,01) entre o total de células (**) e a exsudação (#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

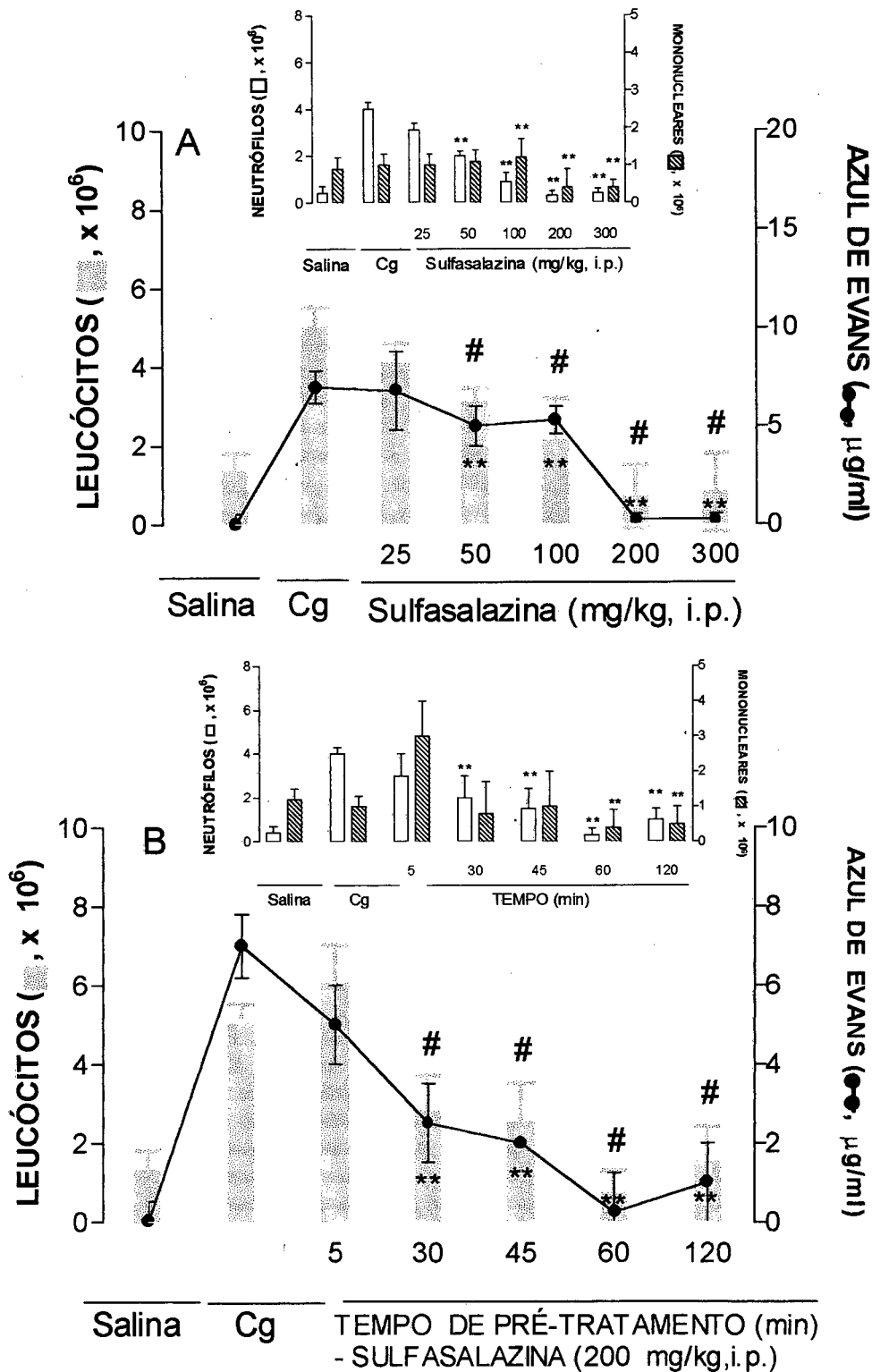


figura 22- Efeito da sulfasalazina sobre a migração celular e a exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina (Cg 1%) em camundongos. A- Efeito de diferentes doses da sulfasalazina (25-300 mg/kg, i.p.), administradas 60 min antes da pleurisia. Cg = respostas obtidas de animais tratados com carragenina (1%). B- Efeito da sulfasalazina (200 mg/kg, i.p.), administrada de 5 a 120 min antes da pleurisia na mesma condição experimental. As inserções mostram os efeitos da droga sobre a migração de neutrófilos e de mononucleares. Cada grupo representa a média de 6-10 animais, e as barras verticais o e.p.m. Asteriscos dentro e fora das colunas indicam as diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre o total de células (**) e a exsudação(#), em relação aos respectivos Controles (Cg). Em alguns experimentos, os valores do e.p.m. se sobrepuseram ao desenho das colunas.

B-) Efeito da associação de doses subliminares de inibidores do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (PDTC e sulfasalazina) com drogas antiinflamatórias

A associação de doses subliminares de drogas antiinflamatórias: indometacina (0,5 mg/kg, i.p., 30 min antes); meloxicam (0,5 mg/kg, v.o, 30 min); nabumetona (5 mg/kg, v.o., 30 min); diacereína (5 mg/kg, v.o., 30 min antes); dexametasona (0,05 mg/kg, i.p, 30 min antes) e do PDTC ou da sulfasalazina (10 mg/cav., i.p., 60 min antes) promoveram inibição significativa tanto da exsudação quanto da migração celular avaliados 4 h após a indução da pleurisia pela carragenina ($P < 0,01$) (Tabelas 6 e 7).

4.1.5 Análise dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25) na resposta inflamatória local

• Na cavidade pleural de animais com pleurisia induzida pela carragenina

Nestas condições experimentais, observou-se aumento significativo de células CD18 positivas, nas duas fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (4 h: $75 \pm 5\%$) (48 h: $72 \pm 3\%$) em relação ao grupo-controle ($54 \pm 5\%$) ($P < 0,05$). Nos intervalos de tempo analisados, as concentrações dos antígenos leucocitários (CD8a, CD11a, CD25 e CD45) não diferiram do grupo controle (Figura 23A, e 24).

Tabela 6- Efeito da associação de doses subliminares do inibidor do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (PDTC) e de drogas antiinflamatórias, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), em camundongos (4 h)

Grupo	Dose (mg/kg)	Leucócitos (x 10 ⁶)	Neutrófilos (x 10 ⁶)	Mononucleares (x 10 ⁶)	Exsudato ^a (µg/ml)
Salina ^d	-	1,3±0,2	1,1±0,7	0,2±0,2	0,02±0,1
PDTC ^b	10	1,3±0,5	0,7±0,2	0,6±0,2	0,0
Carragenina ^d	-	5,6±0,2	5,0±0,1	0,6±0,8	7,5±0,2
Indometacina ^b	0,5	6,5±1,0	6,0±0,5	0,5±1,0	7,0±1,2
Meloxicam ^c	0,5	5,0±1,0	4,0±0,8	1,0±1,3	8,2±0,8
Nabumetona ^c	5	4,8±1,0	4,0±1,2	0,8±0,9	8,5±0,8
Diacereína ^c	5	4,5±0,9	3,5±0,9	1,0±0,8	7,8±1,3
Dexametasona ^b	0,05	4,0±1,2	3,0±0,3	1,0±0,9	7,5±0,5
Indometacina ^b +P DTC ^d	0,5 + 10	3,5±1,0‡	2,3±0,8‡	1,2±1,0‡	5,0±1,0‡
Meloxicam ^c + PDTC ^d	0,5 + 10	3,0±1,0‡	2,0±1,0‡	1,0±1,0	5,0±1,2‡
Nabumetona ^c + PDTC ^d	5 + 10	3,0±1,0‡	2,5±0,3‡	1,5±0,8‡	4,5±0,7‡
Diacereína ^c + PDTC ^d	5+ 10	2,5±0,8‡	2,0±0,5‡	0,5±0,8	3,0±1,2‡
Dexametasona ^b + PDTC ^d	0,05 + 10	0,9±0,8‡	0,4±0,1‡	0,5±0,2	0,25±0,8‡

Os parâmetros foram analisados 4 h após a administração da carragenina ou solução salina, a- Avaliado através da média do extravasamento de azul de Evans; b- Administrado pela via intraperitoneal, 30 min antes; c- administrado pela via oral, 30 min antes; d- Administrado pela via intrapleurar, 30 min antes. Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6-10 animais por grupo). As diferenças estatísticas foram determinadas através do teste de ANOVA, complementados com teste de Dunnett e estão representadas pelo símbolo: ‡ P < 0,01.

Tabela 7- Efeito da associação de doses subliminares do inibidor do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B (sulfasalazina) e de drogas antiinflamatórias, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%) ,em camundongos (4 h)

Grupo	Dose (mg/kg)	Leucócitos (x 10 ⁶)	Neutrófilos (x 10 ⁶)	Mononucleares (x 10 ⁶)	Exsudato ^a (µg/ml)
Salina ^d	-	1,3±0,2	1,1±0,7	0,2±0,2	0,02±0,1
Sulfasalazina	10	1,5±0,5	1,0±0,2	0,5 ±0,2	0,0
Carragenina ^d	-	5,6±0,2	5,0±0,1	0,6±0,8	7,5±0,2
Indometacina ^b	0,5	6,5±1,0	6,0±0,5	0,5±1,0	7,0±1,2
Meloxicam ^c	0,5	5,0±1,0	4,0±0,8	1,0±1,3	8,2±0,8
Nabumetona ^c	5	4,8±1,0	4,0±1,2	0,8±0,9	8,5±0,8
Diacereína ^c	5	4,5±0,9	3,5±0,9	1,0±0,8	7,8±1,3
Dexametasona ^d	0,05	4,0±1,2	3,0±0,3	1,0±0,9	7,5±0,5
Indometacina ^b + sulfasalazina ^d	0,5 + 10	4,0±1,3‡	3,0±0,8‡	1,0±1,0‡	5,0±1,0‡
Meloxicam ^c + Sulfasalazina ^d	0,5 + 10	3,8±1,4‡	2,0±1,0	1,8±1,0	4,0±1,2‡
Nabumetona ^c + Sulfasalazina ^d	5 + 10	4,2±1,5‡	3,0±0,3	1,2±0,8‡	4,2±0,7‡
Diacereína ^c + Sulfasalazina ^d	5+ 10	3,5±1,3‡	2,0±0,5	1,5±0,8	3,0±1,2‡
Dexametasona ^b + sulfasalazina ^d	0,05 + 10	1,4±0,7‡	0,6±0,1‡	0,8±0,2	1,0±0,8‡

Os parâmetros foram analisados 4 h após a administração da carragenina ou solução salina, a- Avaliado através da média do extravasamento de azul de Evans; b- Administrado pela via intraperitoneal, 30 min antes; c- administrado pela via oral, 30 min antes; d- Administrado pela via intrapleural, 30 min antes, Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6-10 animais por grupo). As diferenças estatísticas foram determinadas através do teste de ANOVA, complementados com teste de Dunnett e estão representadas pelo símbolo: ‡ P < 0,01.

4.1.6 Análise da resposta inflamatória sistêmica no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

- **Análise da permeabilidade vascular em animais com pleurisia**

Nas duas fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina, não foi observado alterações significativas nos níveis (mediana e amplitude) de azul de Evans nos órgãos estudados, 4 e 48 h: baço: 36,5; 30-71 e 43,4; 16,6-33,4 $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido; pulmão: 48,4; 50,3-164,5 e 48,1; 21,5-49,2 $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido, respectivamente) em comparação ao grupo-controle baço: 42; 20-59,3; pulmão: 39,3; 21,5-65,8 $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido ($P > 0,01$). Além disso, no coração e nos rins também não foram observados diferenças significativas deste parâmetro quando comparados ao grupo-controle, sendo os valores dos níveis de azul de Evans encontrados inferiores a 1 $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido.

4.1.7 Análise dos antígenos leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25, CD45) no sangue total e em tecidos (pulmão e baço) de animais com pleurisia

As concentrações dos marcadores leucocitários (CD8, CD11a, CD18, CD25 e CD45) em amostras de sangue total de animais com pleurisia (4 e 48 h) não diferiram em relação ao grupo-controle ($P > 0,01$) (Figura 23C).

Em relação ao pulmão, observou-se aumento de células positivas para CD18 em ambas as fases (4 e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (1%) ($P < 0,05$) (Figura 23B e 25). Aumento significativo da expressão celular do CD45 foi observado apenas na segunda fase (48 h) desta resposta inflamatória ($P <$

0,01) (resultados não mostrados). Além disso, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, nenhuma alteração na expressão dos marcadores leucocitários estudados foram observados no baço (Figura 23D).

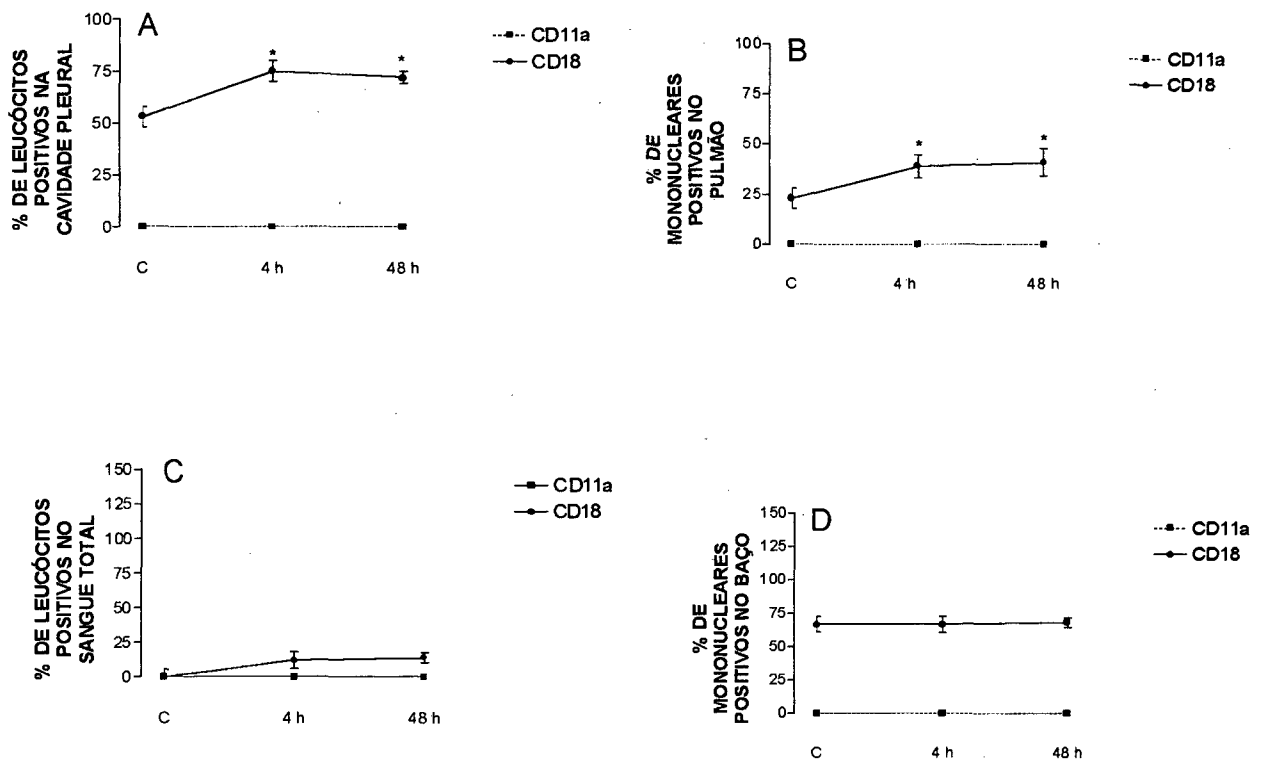


Figura 23- Percentual dos linfócitos CD11a e CD18 positivos na cavidade pleural (A), pulmão (B), sangue total (C) e baço (D) obtidos de animais-controle (C) e com pleurisia. Cada linha representa a média de um pool de 2 a 4 órgãos de 4 a 6 animais, em cada grupo de experimentos e os símbolos (*) indicam o e.p.m. ** P < 0,05.

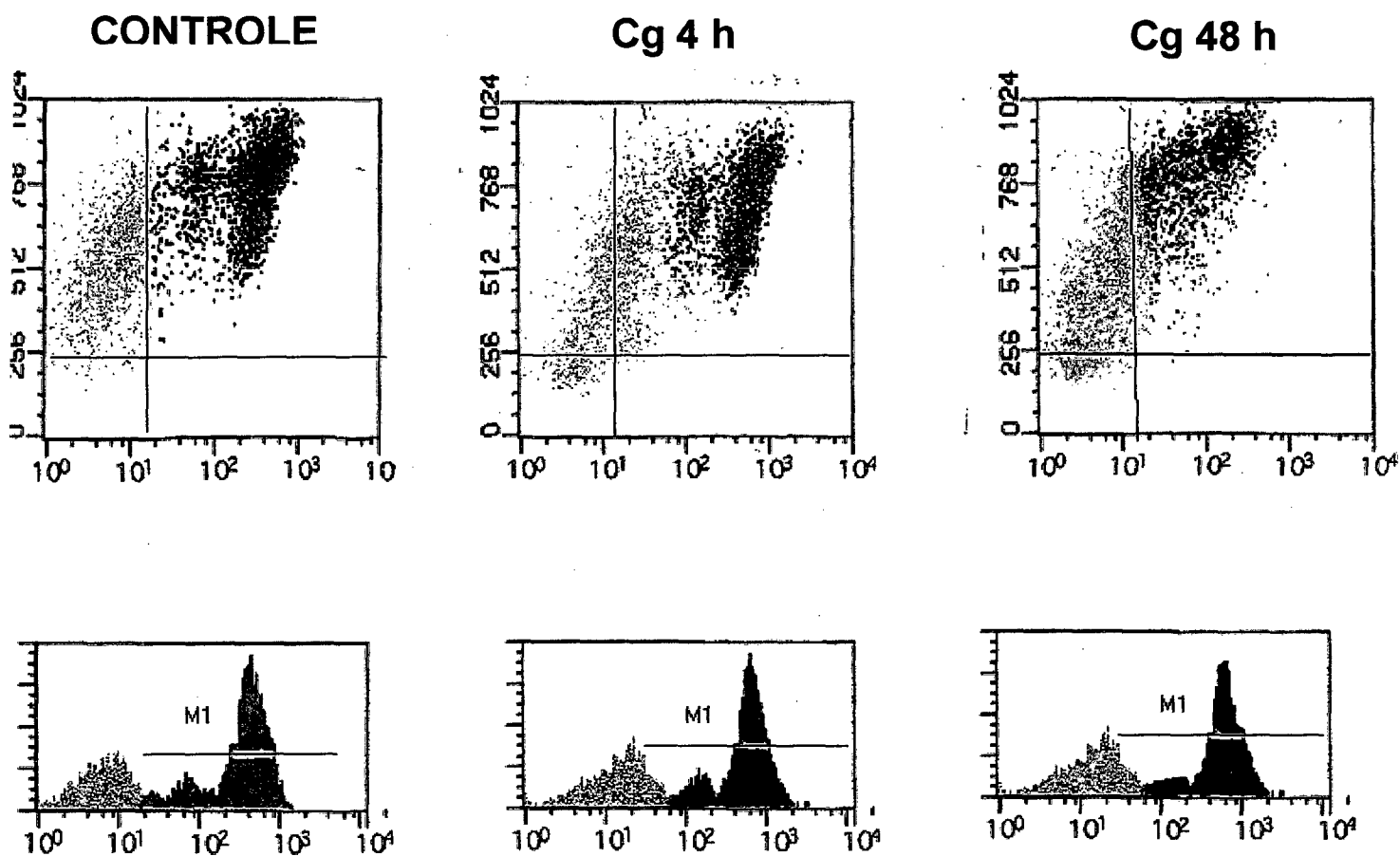


Figura 24- Análise pela citometria de fluxo de leucócitos CD18 positivos da cavidade pleural de animais-controle (tratados com salina) e com carragenina (Cg, 1%). ITCF = isotiocianato de fluoresceína. O painel superior, quadrante direito e M1 representam as células positivas. Os dados representam a média de 3 a 4 experimentos de um pool de 3-4 animais.

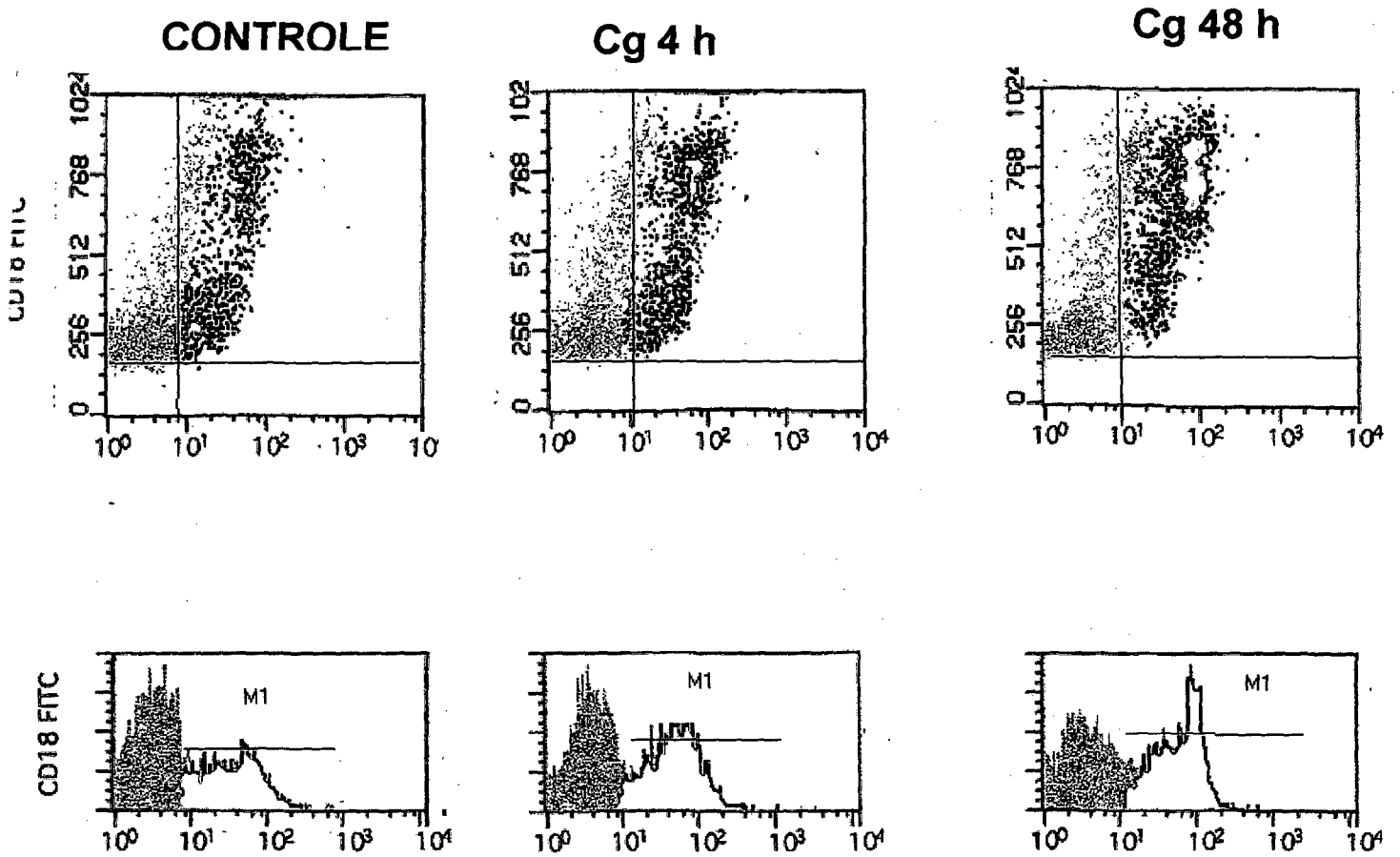


Figura 25- Análise pela citometria de fluxo de leucócitos CD18 positivos do pulmão de animais-controle (tratados com salina) e com carragenina (Cg, 1%). ITCF = isotiocianato de fluoresceína. O painel superior, quadrante direito e M1 representam as células positivas. Os dados representam a média de 3 a 4 experimentos de um pool de 3-4 animais.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho contribuem significativamente para ampliar os conhecimentos acerca dos mecanismos relacionados com o processo inflamatório na cavidade pleural. No caso específico, foram estudadas: a participação de mediadores inflamatórios (bradicinina, óxido nítrico, histamina, citocinas), além das moléculas de adesão nas duas fases (4 e 48 h) da resposta induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos, bem como as possíveis implicações sistêmicas deste processo inflamatório. No futuro, a confirmação dos resultados alcançados com experimentos complementares servirá para orientar novos estudos ou o desenvolvimento de drogas com potencial terapêutico antiinflamatório.

A resposta inflamatória bifásica (4 e 48 h) induzida pela carragenina, tanto em relação à exsudação como à migração celular, foi paralelamente acompanhada pelo aumento das concentrações de nitrito/nitrato na cavidade pleural de camundongos. Tais resultados estão de acordo com estudos realizados por TRACEY et al. (1995), que demonstraram estar o óxido nítrico envolvido na resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de ratos. Suas experimentações evidenciaram que a atividade da óxido nítrico-sintase nas células inflamatórias da cavidade pleural de ratos estava aumentada. Por outro lado, essa atividade mostrou-se independente do complexo cálcio/calmodulina, indicando, assim, a indução da isoforma óxido nítrico-sintase induzida nas células inflamatórias da cavidade pleural de ratos. Além disso, a importância do papel do óxido nítrico tem sido demonstrada em outros modelos de inflamação, como, por

exemplo: no edema de pata induzido pela carragenina (IALENTI et al., 1992), na inflamação neurogênica induzida pelo óleo de mostarda, na pele de pata de ratos (LIPPE et al., 1993), além da inflamação crônica demonstrada no modelo da artrite (IALENTI et al., 1993; MCCARTNEY-FRANCIS et al., 1993). Assim, pelos resultados apresentados até o momento, é possível sugerir que os níveis de nitrito/nitrato encontrados na cavidade pleural de camundongos representam, também, a liberação do óxido nítrico pelas células da cavidade pleural, após ativação das enzimas NO-sintases constitutiva e induzida. Já o aumento nos níveis da mieloperoxidase foi somente detectado na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória, mantendo uma correlação positiva com o número de neutrófilos. Tais constatações estão de acordo com dados apresentados na literatura que demonstram ser esta enzima (mieloperoxidase) um marcador de neutrófilos (KRAWIZ et al., 1984; RAO et al., 1993). Por outro lado, o fato de as concentrações de nitrito/nitrato não estarem correlacionadas nem com os níveis de neutrófilos nem com os de mononucleares é indicativo de que o óxido nítrico provém de diferentes fontes celulares, além dos leucócitos (DI ROSA et al., 1996; BARNES et al., 1998). Observa-se, também, que, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, os níveis de leucócitos, da mieloperoxidase, bem como a exsudação, foram reduzidos, de forma significativa, por drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais. Contudo, os níveis de nitrito/nitrato foram inibidos pela diacereína, pela nabumetona e por inibidores específicos da enzima NO-sintase. O mesmo não ocorreu em relação à segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, em que somente a

dexametasona e a diacereína inibiram os leucócitos, e a terfenadina, a exsudação. Os resultados obtidos sugerem que o efeito inibitório das drogas aqui estudadas sobre os parâmetros inflamatórios analisados não ocorre de forma uniforme. Além disso, essas drogas antiinflamatórias podem exercer seu papel por meio da inibição da via da mieloperoxidase, das enzimas NO-sintases, ou ambas as vias.

Outra etapa do protocolo experimental aqui discutido foi avaliar a participação do receptor B₂ da bradicinina, no modelo estudado, em camundongos (SALEH et al., 1998; FRÖDE-SALEH et al., 1999). Várias evidências têm demonstrado o envolvimento das cininas por meio da ativação dos receptores B₁ ou B₂, modulando, assim, as respostas inflamatórias e analgésicas (HALL, 1992; MARCEAU, 1995; HALL e MORTON, 1997). Além disso, a bradicinina, nas vias aéreas da maioria das espécies animais, promove broncoconstrição, estimulação das fibras nervosas sensoriais, aumento de secreção e muco, e também extravasamento plasmático (BARNES et al., 1988; LEMBECK et al., 1991; SAKAMOTO et al., 1992; 1993). Estudos em que foram utilizadas técnicas com radioligantes e testes *in vitro*, com traquéia de cobaia, demonstraram a presença de sítios específicos para os receptores B₂ da bradicinina, em tecidos das vias aéreas de diferentes espécies animais (TRIFILIEFF et al., 1991; FIELD et al., 1992). Observa-se, ainda, que a distribuição desses sítios, no pulmão de cobaia e em humanos, correlaciona-se com os efeitos funcionais das cininas, sugerindo que a bradicinina possui ação direta na musculatura lisa periférica das vias aéreas (MAK e BARNES, 1991). Estudos têm demonstrado que a

administração de bradicinina, por meio de aerossóis ou instilação, promove broncoconstrição em humanos e em cobaia, por meio da estimulação de fibras nervosas sensoriais, que, por sua vez, liberam acetilcolina das terminações pós-ganglionares (ICHINOSE e BARNES, 1990; ICHINOSE et al., 1990).

Os antagonistas peptídicos estudados em nosso modelo experimental, HOE 140 e NPC 17731-que possuem tanto uma meia vida média prolongada (maior que 6 horas) como maior potência, em comparação com outros previamente desenvolvidos (KYLE et al., 1991; WIRTH et al., 1991)-, foram efetivos em bloquear, de forma significativa, a primeira fase (4 h) da reação inflamatória induzida pela carragenina, indicando que este receptor está envolvido no modelo de inflamação. Tais resultados são relevantes, uma vez que revelam possuírem os agentes envolvidos potencial terapêutico (WIRTH et al., 1991), e apoiam as evidências de que os antagonistas peptídicos do receptor B₂ da bradicinina, além de suas propriedades analgésicas, analisadas nos modelos de dor induzida por cristais de uratos, formalina ou ácido acético (STERANKA e BURCH, 1991; BHOOLA et al., 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; DE CAMPOS et al., 1996; 1999), também possuem ação antiinflamatória. Todavia, a administração prévia de cada um dos compostos não modificou os parâmetros inflamatórios observados 48 h após a injeção do agente flogístico.

Em nossos estudos, os efeitos antiinflamatórios do HOE 140 e do NPC 17731, na dose de 1 pmol/cav., foram significativamente prolongados. As conclusões são apoiadas no fato de que se pôde observar inibição significativa, tanto da migração celular como da exsudação, quando tais

antagonistas foram administrados até 24 h antes da indução da pleurisia. Além disso, os resultados obtidos com o HOE 140 e o NPC 17731 foram também validados em outro grupo de experimentos, em que se utilizou outro antagonista não-peptídico do receptor B_2 da bradicinina: NPC 18884 (CHAKRAVARTY et al., 1996). Este composto, administrado pelas vias intraperitoneal ou oral, agiu de forma dose-dependente, inibindo os mesmos parâmetros inflamatórios estudados. Estes resultados confirmam, portanto, a eficácia dos referidos agentes, no tratamento do processo inflamatório, quando administrados por via oral (WIRTH et al., 1991).

A análise conjunta dos resultados obtidos com HOE 140, NPC 17731 e NPC 18884 permite concluir que a primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina é, em parte, mediada pela bradicinina, com a ativação do seu receptor B_2 , confirmando estudos realizados por diversos autores em outros modelos de inflamação aguda induzidos por este mesmo agente flogístico (COSTELLO e HARGREAVES, 1989; BURCH e DEHAAS, 1990; DAMAS et al., 1990; WIRTH et al., 1991; DE CAMPOS et al., 1996). Além disso, as propriedades antiinflamatórias dos antagonistas seletivos do receptor B_2 da bradicinina podem ser ferramentas farmacológicas importantes na investigação do papel das cininas em processos fisiológicos e patológicos, bem como no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento dos processos inflamatórios, principalmente das vias aéreas, como no caso da asma brônquica.

Neste modelo experimental, foram também realizados experimentos para analisar o papel da bradicinina na liberação de óxido nítrico e da

mieloperoxidase. Sabe-se que a cadeia de eventos extracelulares que se segue à ativação do receptor B₂ da bradicinina resulta na geração de distintos segundo-mensageiros, entre eles o óxido nítrico, produtos da via do ácido araquidônico, dando-se também o aumento de cálcio intracelular, importante para a liberação de enzimas como a mieloperoxidase. No modelo experimental estudado, o HOE 140 e o NPC 17731 não foram efetivos em inibir a geração de óxido nítrico, avaliado indiretamente pelas concentrações de nitrito/nitrato. A participação do óxido nítrico, todavia, neste modelo, é bem conhecida (SAUTEBIN e DI ROSA, 1994; SAUTEBIN et al., 1995; 1998; TOMLINSON et al., 1994; TRACEY et al., 1995). Demonstrou-se aqui que o aumento dos níveis de nitrato resulta da ativação das NO-sintases constitutivas e da expressão da forma induzida em diferentes tipos celulares.

Em nosso modelo experimental de inflamação, a participação do óxido nítrico pode ser sugerida com base nas seguintes evidências: 1) aumento das concentrações de nitrito/nitrato em ambas as fases (4 e 48 h); e 2) eficiência dos inibidores específicos das vias de síntese do óxido nítrico a L-NOARG e a L-NAME em inibir a primeira fase (4 h) do processo inflamatório analisado.

Um aspecto que merece ser destacado, neste modelo de inflamação, é a inibição da migração celular observada, mais especificamente de neutrófilos, e da liberação de mieloperoxidase pelos antagonistas do receptor B₂ da bradicinina. Levando-se em consideração que, em estudos anteriores, SALEH et al. (1997) demonstraram que a administração intrapleural de bradicinina estimula a migração celular, preferencialmente de mononucleares, os resultados alcançados indicam que esta cinina, além dos seus efeitos

edematogênicos, também estimula o influxo de células para o sítio do processo inflamatório. Os dados do presente trabalho sugerem que este mediador também está envolvido com a migração de polimorfonucleares e a liberação da mieloperoxidase.

Outro mediador envolvido na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos é a histamina. A conclusão é baseada nos resultados em que a terfenadina, antagonista do receptor H_1 da histamina, causou diminuição significativa tanto da migração celular como da exsudação, na primeira fase (4 h) do processo inflamatório. Como a terfenadina, na dose estudada, foi capaz de também inibir a exsudação após 48 h, é possível sugerir que a histamina participa de ambas as fases (4 e 48 h) da resposta inflamatória. Já se comprovou que esse mediador liberado dos mastócitos exerce papel importante no aumento da permeabilidade vascular, no sítio do processo inflamatório (GREIFF et al., 1998; EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD et al., 1999). Todavia os resultados obtidos com o antagonista do receptor H_1 da histamina permitem também sugerir que tal mediador está envolvido no processo de migração celular, na inflamação induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos.

Outro mediador importante e claramente envolvido na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, em nosso modelo experimental, são os prostanóides. Este fato é comprovado pela constatação de que drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais inibiram os níveis da mieloperoxidase, da migração celular e da exsudação causadas pela carragenina. Além disso, estudos realizados por TOMLINSON et al., 1994, demonstraram que neste modelo de inflamação é observado aumento da atividade

da ciclooxigenase, bem como da óxido-nítrico sintase induzida. O NO pode também aumentar a síntese de prostanóides, por meio de reações de nitrosilação do resíduo de cisteína existente no domínio catalítico da enzima ciclooxigenase (HAJJAR et al., 1995). De fato, a estimulação ou inibição da produção de óxido nítrico, em tecido pulmonar de ratos, está associada ao aumento ou à diminuição de metabólitos da via do ácido araquidônico (6-ceto-PGF α), sugerindo que o óxido nítrico pode modular a produção de prostanóides, resultando na amplificação da resposta inflamatória (SAUTEBIN e DI ROSA, 1994). O mesmo resultado não foi observado na segunda fase (48 h) desta resposta inflamatória. No entanto, não podemos descartar a participação dos prostanóides na resposta inflamatória tardia (48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, pois diferentes fatores podem contribuir para esta resposta, entre eles destacam-se: a farmacocinética das drogas estudadas, a eficácia em inibir as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 em diferentes tipos celulares, além do período de tratamento prévio insuficiente dos animais. Em conjunto os resultados até agora apresentados demonstram o envolvimento de múltiplos mediadores liberados na resposta inflamatória à carragenina e os diferentes mecanismos de ação antiinflamatória, bem como diferentes grau de inibição das drogas utilizadas sobre os níveis da mieloperoxidase, do nitrito/nitrato, da migração celular e/ou da exsudação.

Em outra série de experimentos, demonstrou-se a participação da IL-1, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos, por meio do uso do antagonista natural do receptor da IL-1

(IL1-RA) e de anticorpos-policlonais (anti-IL-1 β). Estudos têm demonstrado que os macrófagos são as principais fontes de liberação da IL-1 β (DINARELLO, 1988c). Além disso, outras células residentes também são capazes de produzir pequenas quantidades desta citocina após estimulação com a carragenina. A IL-1 β também é capaz de induzir a liberação de outras citocinas, bem como metabólitos da via do ácido araquidônico, amplificando a resposta inflamatória (DINARELLO, 1988c; DOZEN et al., 1989). Quando liberada, a IL-1 β interage com, pelo menos, dois tipos de receptores: tipo I (IL-1RI) e tipo II (IL-1RII). O receptor do tipo I é encontrado principalmente em linfócitos T e em fibroblastos, enquanto que o tipo II é expresso em linfócitos B, monócitos e neutrófilos. Entretanto diversos estudos têm demonstrado a presença de receptores do tipo I nos neutrófilos e nas células epiteliais (MATSUKAWA et al., 1995; BRANDOLINI et al., 1997). Parece que a IL-1 β age preferencialmente em receptores do tipo I, enquanto o antagonista natural do receptor da IL-1 (IL1-RA), uma citocina antiinflamatória, liga-se preferencialmente aos receptores tipo 1 e, com menos afinidade, ao tipo II (DINARELLO, 1988a, b; CARTER et al., 1990; AREND, 1991; 1993; SIMMS e DOWER, 1994; BROOKS et al., 1994). São, atualmente, reconhecidas três isoformas do IL1-RA: a secretória (sIL-1ra), sintetizada pelos monócitos e macrófagos ativados (EISENBERG et al., 1990), e duas intracelulares (icIL-1ral e icIL-1rall), produzidas pelas células epiteliais e por polimorfonucleares, respectivamente (HASKILL et al., 1991; MUZIO et al., 1995).

A administração do IL1-RA associado à carragenina inibiu de forma significativa a migração celular, caracterizada pelo influxo de neutrófilos, e a exsudação, na cavidade pleural, tanto após 4 h como após 48 h. Esses resultados estão de acordo com trabalhos realizados por PERRETTI et al. (1993), que demonstraram ter sido esse antagonista natural do receptor da IL-1 efetivo em inibir a migração de neutrófilos induzida por esta citocina, no modelo da bolsa de ar (*air pouch model*), em camundongos, no choque séptico induzido por *Escherichia coli* em pulmão de coelhos (OHLSSON et al., 1990), na inflamação pulmonar aguda induzida por LPS ou IL-1 (ULICH et al., 1991a, b), além de possuir efeito protetor no pulmão de ratos, após a administração intratecal de endotoxina ou da IL-1 (ULICH et al., 1991c). Os efeitos antiinflamatórios do IL1-RA também foram demonstrados em outros modelos *in vitro*, situações em que inibiu a produção de PGE₂ liberada de fibroblastos da derme, bem como a adesão de neutrófilos a células endoteliais (DINARELLO, 1988b; CARTER et al., 1990; AREND et al., 1991). Nestas células, a importância da ativação do receptor tipo I é bastante significativa, em razão de estar sua ativação relacionada com a liberação de mediadores químicos, bem como com a migração celular. Além disso, no homem, o IL1-RA tem sido relacionado à patogênese da síndrome da angústia respiratória (SARA), sendo que aumentos da morbidade e da mortalidade estão correlacionados com baixas concentrações, no lavado bronco-alveolar (DONNELLY et al., 1996).

Por sua vez, a administração do anticorpo-policlonal anti-IL-1 β inibiu a primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina. É interessante ressaltar que a ação pró-inflamatória desta citocina tem sido evidenciada indiretamente através do emprego do seu anticorpo específico em vários modelos experimentais. Assim, estudos *in vivo* têm demonstrado que o tratamento de camundongos com anticorpos anti-IL-1 β diminui: a resposta inflamatória induzida por endotoxinas no modelo de otite (KURONO et al., 1998); a pleurisia e a peritonite induzidas pelo zimosan, em ratos e em camundongos, respectivamente (PERRETTI et al., 1992); a artrite induzida por imunocomplexo (VAN LENT et al., 1995) ou albumina bovina (VAN DE LOO et al., 1995a, b); além da formação de granulomas pulmonares (FLORY et al., 1995).

Nossos resultados apresentados até agora, portanto, sugerem, em consideráveis evidências, a participação da citocina IL-1 β na resposta inflamatória induzida pela carragenina, pois tanto o anticorpo-policlonal anti-IL-1 β como o antagonista natural do receptor da IL-1 (IL1-RA) inibiram os parâmetros inflamatórios estudados.

Resultados semelhantes foram obtidos com o uso de anticorpos-policlonais anti-TNF α . Estes anticorpos inibiram o influxo de leucócitos e da exsudação na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina. Estudos revelam que a administração de anticorpo anti-TNF α inibe o edema e o influxo celular na artrite em ratos (ISSEKUTZ et al., 1994; MIYAMOTO et al., 1997; SCHADLICH et al., 1999), a liberação de mediadores

inflamatórios na colite induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfúrico (VIDELA et al., 1998), a migração de leucócitos na pleurisia causada pelo LPS (EDAMITSU et al., 1995), além de prolongar a sobrevivência de camundongos no modelo de sepse induzida pelo extravasamento fecal (O'RIORDAIN et al., 1996). Em experimentos *in vitro*, o anticorpo anti-TNF α também foi efetivo em inibir a proliferação de células pulmonares estimuladas pelo LPS (KWONG et al., 1998).

Em relação à segunda fase (48 h) do processo inflamatório estudado, tanto os anticorpos anti-TNF α como os anti-IL1 β aumentaram significativamente a migração de leucócitos e a exsudação. Este efeito poderia estar, em parte, relacionado com a curta meia-vida do anticorpo, bem como com a persistência do estímulo inflamatório. Além disso, a exata concentração do anticorpo necessária para neutralizar a atividade da sua citocina respectiva parece ser dependente do tipo de células envolvidas, das condições de crescimento celular, bem como, do tipo de processo inflamatório estudado. Estes resultados são corroborados em estudos realizados por DENIS et al. (1991a, b) que demonstraram, por meio de anticorpos seletivos anti-TNF α , que o TNF α possui papel importante no controle da inflamação pulmonar induzida por *Micropolyspora faeni*, agente causador de pneumonia, em camundongos. Além disso, o TNF α exerce importante papel protetor em resposta a outros microorganismos, como, por exemplo: *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Micobacterium tuberculosis* (FLYN et al., 1995; GOSSELIN et

al., 1995; LAICHALK et al., 1996; TAKASHIMA et al., 1997). Estudos realizados por SMITH et al. (1998), utilizando camundongos transgênicos, que expressam inibidor para o $TNF\alpha$, demonstraram que o $TNF\alpha$ contribui para a defesa pulmonar contra agentes microbianos e que o efeito protetor, em nível pulmonar ou extra-pulmonar, depende da natureza do estímulo inflamatório.

Em outra etapa do nosso protocolo experimental, foi utilizado o anticorpo-policlonal humano anti-IL-8. Os resultados obtidos indicam que esta citocina também exerce ações pró-inflamatórias, uma vez que os parâmetros inflamatórios (influxo celular, às custas de neutrófilos) e a exsudação da primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina foram significativamente inibidos. MULLIGAN et al. (1993) demonstraram que anticorpos específicos para a IL-8 inibiram o influxo de neutrófilos induzido por endotoxinas no modelo da pleurisia em coelhos. Além disso, no modelo experimental anterior à administração do anticorpo anti-IL-8 inibiu o influxo celular e a permeabilidade vascular induzidas por LPS (FUKUMOTO et al., 1998), por bactérias gram-negativas (BOYLAN et al., 1994) ou por asbestos (BOYLAN et al., 1992). Em modelos *in vitro* demonstrou-se que este anticorpo inibiu a migração de leucócitos na artrite induzida por LPS, na glomerulonefrite induzida por imunocomplexos e na injúria de reperfusão pulmonar (HARADA et al., 1994). Os resultados da literatura, juntamente com os obtidos em nosso laboratório, apoiam as evidências de que o emprego destes anticorpos, tanto em estudos pré-clínicos (STANDIFORD et al., 1990,

1993; MATTHEUS et al., 1997) como clínicos (AL-MUGHALES et al., 1996), apresentam efeitos antiinflamatórios.

Em nosso estudo, todavia, a administração *per se* das citocinas-recombinantes citadas anteriormente reproduziram apenas parcialmente os seus efeitos pró-inflamatórios. Desta forma, a administração de IL-1 β murino ou do TNF α murino em associação com a carragenina causou apenas aumento significativo da exsudação na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória. Em tais condições, as citocinas estudadas promoveram redução significativa da migração celular. Conforme anteriormente comentado, os resultados discrepantes entre os protocolos em que se utilizou a citocina e em que se utilizou o seu anticorpo específico podem estar, em parte, relacionados com o fato de que as concentrações das substâncias, para induzir efeitos pró-inflamatórios são bastante variáveis, ou pelo fato de que ambos os receptores (tipo I e II) da IL-1 β são capazes de regular a resposta inflamatória, promovendo a redução da migração celular induzida por esta citocina ou pelo TNF α (MATSUSHIMA et al., 1986; HOLTMANN e WALLACH, 1987). A diminuição da migração celular poderia ser explicada, em parte, pela inibição da expressão de moléculas de adesão e não pelo bloqueio de mediadores vasoativos induzidos por estas citocinas. Isto explicaria a diminuição da migração celular e o aumento concomitante da exsudação. Embora seja difícil interpretar estes resultados, os dados aqui apresentados mostram que a migração celular e o aumento da permeabilidade vascular (exsudação) ocorrem independentes um do outro. Em relação à segunda fase (48 h) desta

resposta inflamatória, as citocinas apresentam efeito modulatório diferente. O $TNF\alpha$ não modificou a migração celular e aumentou a exsudação, ao passo que a $IL-1\beta$, em doses 10 vezes menores (0,05 ng/cav.), aumentou tanto o influxo de leucócitos como a exsudação. Estes resultados sugerem que diferentes mediadores inflamatórios estão envolvidos em cada fase da resposta inflamatória induzida pela carragenina, na cavidade pleural de camundongos (UTSUNOMIYA et al., 1991; ZASSHI, 1997).

No presente estudo, a administração intrapleural da IL-8 humana em associação com o agente flogístico causou aumento tanto da exsudação como da migração celular. A IL-8 é uma quimocina composta por 72 aminoácidos (MATSUSHIMA et al., 1988; STRIETER et al., 1989), razão pela qual está implicada em várias doenças das vias aéreas, como, por exemplo, a fibrose pulmonar, a SARA e a bronquite crônica (CARRÉ et al., 1991; MILLER et al., 1992; RICHMAN-EISENSTAT et al., 1993). A IL-8 é liberada por diferentes tipos celulares, inclusive os macrófagos (STANDIFORD et al., 1990, 1993a). Níveis aumentados de IL-8 têm sido encontrados no lavado bronco-alveolar de pacientes com asma brônquica (STANDIFORD et al., 1990, 1993a, b). Além disso, estudos também têm demonstrado que o $TNF\alpha$ ou a $IL-1\beta$ são capazes de aumentar a expressão da IL-8 em células epiteliais e em fibroblastos das vias aéreas de cobaia e de humanos (STANDIFORD et al., 1990; 1993a; NAKAMURA et al., 1991). Em modelos animais, a IL-8 tem sido encontrada na inflamação mediada por neutrófilos (BEAUBIEN et al., 1990; BOYLAN et al., 1992). Além disso, nas mesmas condições

experimentais, a administração da IL-8 na cavidade pleural de camundongos com a carragenina aumentou significativamente a migração de polimorfonucleares somente na primeira fase (4 h) da pleurisia, demonstrando que esta citocina possui efeitos distintos em relação às duas fases da resposta inflamatória, bem como das outras citocinas aqui estudadas. Os resultados encontrados estão, portanto, de acordo com outros estudos realizados por PERRETTI et al. (1992) e por VAN DEN HEUVEL et al. (1998), que demonstraram que a IL-8 é um potente agente quimiotático para os neutrófilos. Considere-se, também, que estudos *in vitro* utilizando neutrófilos humanos demonstram que a ativação do receptor do tipo I da IL-1 β , por meio desta citocina ou do TNF α , potencializa a liberação de elastase dos neutrófilos, bem como promove a quimiotaxia destas células, em resposta à IL-8 (BRANDOLINI et al., 1997). A IL-8 também pode induzir a liberação de outras citocinas, como, por exemplo, a IL-1 β e o IL-1RA, amplificando a liberação de outras citocinas (MATSUKAWA et al., 1995). O efeito da IL-8, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, foi menos intenso, havendo aumento, apenas da exsudação, somente quando se utilizaram doses mais elevadas (100 ng/cav.). Este fato poderia ser explicado pelos achados predominantes de células do tipo mononucleares, nesta fase do processo inflamatório.

Diante do acima descrito, não se pode descartar também a possibilidade de que vários fatores possam estar-se combinando para as diferenças nos resultados observados, tanto na permeabilidade vascular como

no influxo de células. Possíveis diferenças relacionadas com o sítio do processo inflamatório, com a espécie animal estudada, bem como com a estrutura molecular das citocinas empregadas, a natureza do agente flogístico, o período de tempo em que os parâmetros foram estudados, entre outros aspectos, poderiam influenciar sua ligação com os respectivos receptores como determinar maior ou menor suscetibilidade à degradação enzimática. Esta hipótese não pode ser descartada, uma vez que não se dispõe na literatura das dosagens das citocinas utilizadas neste modelo experimental. Neste contexto, no modelo da pleurisia, induzida pelo zimozan, em ratos, o aumento das concentrações do TNF α e da IL-1 β , que ocorre no exsudato pleural 1-2 h após a administração do agente flogístico, precede o influxo de neutrófilos, que ocorre 4-5 h após (UTSUNOMIYA et al., 1998).

Em relação às citocinas-recombinantes com atividade antiinflamatória reconhecida, a IL-6 murino e a IL-10 humana foram também estudadas no modelo da pleurisia, em camundongos. Neste trabalho, a administração de anticorpos-policlonais anti-IL-6 causou aumento significativo da exsudação (4 e 48 h) e da migração celular (48 h). Vários trabalhos têm demonstrado que a administração do anticorpo anti-IL-6 potencializa vários parâmetros inflamatórios. Desta forma, em camundongos, este anticorpo inibiu a expressão do RNAm para o IL1-RA, no modelo de infecção oral induzida pela *Yersinia enterocolitica* (JORDAN et al., 1995) e aumentou o influxo de neutrófilos e de linfócitos pulmonares induzido pelo *Pneumocistis carini* (CHEN et al., 1993).

Em contrapartida, a IL-6 utilizada inibiu os parâmetros da primeira (4 h) e da segunda (48 h) fases do processo inflamatório estudado. Estes resultados confirmam estudos realizados, em pulmão de camundongos, no modelo de choque séptico, em que se observou que esta citocina possui papel antiinflamatório importante, tanto em nível local quanto sistêmico (XING et al., 1998). Outros estudos, utilizando o mesmo modelo experimental, sugerem que a IL-6 exerceria estes efeitos através do controle da expressão dos genes para o $TNF\alpha$ e para a IL-1 β (ULICH et al., 1991c).

De maneira similar à citocina-recombinante IL-6 murino, a IL-10 humana também foi efetiva em inibir o processo inflamatório no modelo experimental estudado. Esta citocina inibiu significativamente os parâmetros inflamatórios (migração celular e exsudação) apenas 4 h após a administração da carragenina. Essa inibição poderia ser atribuída, em parte, a suas propriedades inibitórias sobre outras citocinas, como o $TNF\alpha$ e a IL-1 β , responsáveis por induzir exsudação e quimiotaxia celular (FIORENTINO et al., 1991; QIU et al., 1999; SHIN et al., 1999). As propriedades antiinflamatórias desta citocina têm sido descritas, em vários modelos animais de inflamação (ZUANY-AMORIM et al., 1995; 1997; VAN DER POLL et al. 1995), inclusive os que utilizam a carragenina (POOLE et al., 1995), o LPS (FIORENTINO et al., 1991) ou a bradicinina (POOLE et al., 1995) como agentes flogísticos. Outros estudos também têm demonstrado que a IL-10 reduz a ação quimiotática da IL-8, por meio de vários mecanismos, como a inibição do fator de transcrição nuclear (NF- κ B), aumentando a expressão da proteína I κ -B (WANG et al., 1995; EHRLICH et al., 1998), a síntese de ânion

superóxido (BOGDAN et al., 1991) e de metabólitos do NO (GAGINELLA e WALSH, 1992) liberados pelos monócitos e macrófagos ativados.

Em relação à segunda fase (48 h) da resposta inflamatória analisada, a IL-10, na dose estudada, não alterou os parâmetros inflamatórios estudados. Como se comentou anteriormente, fatores como meia vida, especificidade, natureza dos estímulos desencadeantes desta segunda fase poderiam justificar, em parte, as diferenças.

O conjunto dos resultados sugere a participação das citocinas: IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 e IL-10 na pleurisia induzida, pela carragenina, em camundongos. Em relação à segunda fase (48 h), os resultados negativos obtidos não permitem descartar sua participação, uma vez que o perfil temporal destes marcadores inflamatórios na reação inflamatória ainda não foram estabelecidos. Além disso, estas citocinas, de alguma forma, estão envolvidas tanto na primeira (4 h) como na segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina, promovendo ou controlando eventos vasculares e/ou celulares. A inexistência de dados anteriores prejudica, em parte, a interpretação dos resultados dos protocolos em que foram utilizadas as citocinas. Todavia, em que pesem as restrições quanto a sua especificidade e à meia vida, tanto as citocinas quanto seus anticorpos específicos constituem ferramentas adequadas para explorar tais aspectos da reação inflamatória utilizada.

Em outra etapa do nosso protocolo experimental, avaliou-se a participação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, tendo em vista sua importância no sinal de transdução do processo inflamatório.

O NF- κ B, conforme já comentado, exerce papel importante na regulação de genes relacionados com a indução de diversas proteínas (enzimas, por exemplo) do processo inflamatório, sendo, inclusive, capaz de estimular a transcrição de diversas citocinas, como, por exemplo, o TNF α , a IL-1 β , a IL-2, a IL-6, a IL-8, entre outras (SIEBENLIST et al., 1994). Estudos demonstraram que a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B pode ser inibida, *in vitro*, por uma variedade de agentes antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos, radicais livres e agentes quelantes de metais como a superóxido-dismutase (SOD), a catalase, a peroxidase glutaciona redutase (GSH), a N-acetilcisteína, os derivados da vitamina E, o ácido lipóico alfa e certos carbamatos como a pirrolidineditiocarbamato (PDTC) (SCHRECK et al., 1991; CONNER et al., 1996; BÖHRER e NAWROTH. 1998; GRISHAM, 1999). Embora muitos estudos, *in vitro*, tenham demonstrado o papel do NF- κ B, no controle do processo inflamatório, ainda não está claro o seu papel em modelos *in vivo*.

Neste trabalho, o PDTC administrado 1 h antes do agente flogístico promoveu inibição significativa dos parâmetros inflamatórios estudados (exsudação e migração celular), na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória causada pela carragenina. SAKURATA et al. (1996) demonstraram, por meio de técnicas imunofluorescentes, que a translocação da fração p65 do fator de transcrição nuclear NF- κ B do citoplasma para o núcleo, em cultura de fibroblastos da cavidade articular, de pacientes com artrite reumatóide é do tipo bifásico. A translocação desta fração para o

núcleo é observada 30 min após o estímulo, permanecendo durante 1 hora. Decorrido esse período, o fator nuclear NF- κ B é detectado novamente no citoplasma, sendo que de 6 a 9 horas após migra novamente para o núcleo, permanecendo a reação de imunofluorescência positiva até 12 horas após o estímulo. Ressalta-se, todavia, que as propriedades antiinflamatórias do PDTC não resultam exclusivamente das suas ações inibitórias sobre o fator de transcrição nuclear NF- κ B. Assim, vários estudos têm demonstrado efeitos antiinflamatórios deste agente, por meio de outros mecanismos, incluindo o aumento da liberação de IL-10 ou de outro fator de transcrição nuclear denominado AP-1 (NÉMETH et al., 1998; MEYER et al., 1993; PINKUS et al., 1996), inibição da expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-1 (SAKURATA et al., 1996; SAKURAI et al., 1996). Além disso, o PDTC também é capaz de inibir, de forma direta, a atividade da COX-2, tanto em macrófagos (D'ACQUISTO et al., 1997; NEWTON et al., 1997) como em células mesangiais de rato (TETSUKA et al., 1996).

Complementando os resultados acima, outro inibidor do fator de transcrição nuclear NF- κ B estudado foi a sulfasalazina. Esta droga também foi efetiva em inibir os mesmos parâmetros inflamatórios na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória analisada. As propriedades antiinflamatórias do medicamento são bastante conhecidas. Atribuem-se a este agente: a inibição da quimiotaxia de granulócitos, a liberação de ânions superóxidos, a síntese da IL-2, a proliferação de linfócitos, a produção de IL-1 pelos monócitos, bem como a liberação de adenosina, no sítio do processo inflamatório (CARLIN et

al., 1989; GAGINELLA e WALSH, 1992; GADANGI et al., 1996). Outro possível mecanismo de ação antiinflamatória da sulfasalazina é explicado pelo seqüestro de metabólitos intermediários do NO pelos neutrófilos, pelos monócitos e pelos macrófagos (GIONCHETTI et al., 1991; GRISHAM, 1993). Por sua vez, tem-se descrito que a sulfasalazina inibe a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B em células de cólon (SW620) estimuladas por TNF α , LPS ou forbol-ester (WAHL et al., 1998). Mais recentemente, foi demonstrado que a sulfasalazina é capaz de impedir a translocação do fator NF- κ B para o núcleo através da inibição da fosforilação por uma proteína quinase α (quinase α -I κ B) ou outro sinal de transdução e subsequente degradação da proteína I κ B. (WAHL et al., 1998; LIPTAY et al., 1999). Estudos têm também revelado que citocinas do tipo pró-inflamatórias, como, por exemplo, o TNF α , a IL-1 β , ou mesmo componentes do sistema complemento (C5a) são importantes na inflamação pulmonar, em ratos. LENTSCHI et al., 1998, demonstraram que a lesão pulmonar induzida pela formação de imunocomplexos é mediada, em parte, pelas citocinas do tipo TNF α e IL-1 β , por meio da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. Os autores mencionados demonstraram, ainda, que estas citocinas induzem a ativação do NF- κ B em células pulmonares de rato. Experimentos *in vivo* também revelam que a administração intratecal de anticorpos específicos para o TNF α e a IL-1 β diminuíram a translocação do NF- κ B, do citoplasma para o núcleo, por meio da degradação da proteína I κ B α (LENTSCH et al., 1998). É interessante ressaltar que, nestes experimentos, o tratamento simultâneo com

anticorpos anti-TNF α e anti-IL-1 β promove inibição completa da ativação do NF- κ B. Estudos utilizando antioxidantes, como, por exemplo, N-acetilcisteína constata que as mesmas inibem a ativação do NF- κ B, bem como a quimiotaxia de neutrófilos, na inflamação pulmonar, induzida por endotoxinas, em ratos (BLACKWELL et al., 1996). O efeito inibitório da ativação do receptor NF- κ B poderia explicar o efeito benéfico da sulfasalazina no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a colite ulcerativa, a artrite reumatóide e a toxoplasmose (LE ROUIC et al., 1999; DOUGADOS et al., 1999; JUE et al., 1999; HAAGSMA et al., 1999; KAWAGUCHI et al., 1999; O'DELL et al., 1999).

Em outro grupo de experimentos, foi investigado o possível efeito sinérgico de doses subliminares de drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais com o PDTC ou a sulfasalazina. Os resultados mostram que a associação de doses subliminares das drogas mencionadas anteriormente com o PDTC ou a sulfasalazina promoveram efeito inibitório sinérgico, inibindo a migração celular e a exsudação - PDTC: 38 a 84% e 34 a 97%; sulfasalazina: 11 a 75% e 34 a 87%, respectivamente. Os resultados obtidos são interessantes e podem ser uma opção clínica atraente, no caso da sulfasalazina, para a administração crônica de drogas associadas em doenças inflamatórias. Por meio desta associação, constata-se também que se poderia evitar parte dos efeitos colaterais conhecidos dos agentes antiinflamatórios disponíveis. Todavia estudos complementares, incluindo análise toxicológica, devem ser mais detalhadamente desenvolvidas antes do seu uso na prática clínica.

Difíceis de explicar no momento os possíveis mecanismos de ação inibitória dessa associação. No entanto não se pode descartar o fato de que cada droga age em um sítio diferente da resposta inflamatória. É possível, entretanto, que a associação do PDTC ou da sulfasalazina com as drogas estudadas poderia promover, em conjunto, uma resposta de cooperação nos efeitos inibitórios.

Em relação à associação do PDTC ou da sulfasalazina com a dexametasona, estudos têm demonstrado que os glicocorticóides aumentam a estabilidade de proteínas inibitórias do tipo I κ B (SCHEINMAN et al., 1995; AUPHAN et al., 1995; BÖHRER e NAWROTH, 1998). Trabalhos, *in vitro*, realizados por SCHREIBER et al., 1998, confirmam estudos anteriores mostrando que os esteróides são capazes de inibir a ativação do complexo p65 do NF- κ B nas células intestinais de pacientes com doença de Crohn (SCHREIBER et al., 1995). Já trabalhos realizados por BELLA et al., 1997, demonstram que a inibição da atividade do NF- κ B induz a apoptose em hepatócitos murinos. Na verdade, a ação antiinflamatória e imunossupressora dos glicocorticóides dá-se principalmente por sua ação em nível de transcrição proteica. Estas drogas aumentam, também, a liberação de diferentes agentes antiinflamatórios, como, por exemplo, a lipocortina-1 ou a IL-10 ou o IL-1RA (SCHEIMMAN et al., 1995). Assim, estudos têm demonstrado a eficácia da interação sinérgica entre esteróides e ciclosporina ou entre esteróides e ácido retinóico, no tratamento da asma brônquica (WRIGHT et al., 1995; WALLACE et al., 1996). Além disso, a

expressão de diversas enzimas inflamatórias, como, por exemplo, a COX-2 e a NO-sintase induzida é mediada pela ativação do NF- κ B (XIE et al., 1994; LIU et al., 1997; DÁCQUISTO et al., 1999). Este mecanismo pode explicar, em parte, a interação sinérgica entre os inibidores do fator de transcrição nuclear-NF- κ B e as drogas antiinflamatórias utilizadas. Um outro mecanismo seria a liberação de citocinas antiinflamatórias. É conhecido que a administração exógena de citocinas do tipo antiinflamatórias (IL-10 e IL-13) inibe a migração de neutrófilos induzida por imunocomplexos, no pulmão de ratos, por meio da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , em nível transcripcional e aumento da expressão da proteína I κ B (LENTSCH et al., 1997). Contudo, estudos adicionais são necessários para esclarecer o mecanismo exato e o potencial terapêutico da interação entre o PDTC e a sulfasalazina com as drogas antiinflamatórias estudadas.

Os resultados de nossos experimentos apresentados acima sugerem que o fator de transcrição nuclear NF- κ B possui papel importante na modulação da resposta inflamatória induzida pela carragenina, no modelo da pleurisia, em camundongos. A confirmação futura desta hipótese por meio de estudos complementados com biologia molecular é imprescindível, todavia, para esclarecer estes achados. Além disso, os resultados também demonstram uma ação antiinflamatória sinérgica das drogas antiinflamatórias utilizadas e dos inibidores do fator NF- κ B, sugerindo que esta associação pode ser importante, no futuro, para a terapia de certos processos inflamatórios.

Em outra etapa do nosso protocolo experimental, avaliou-se a participação de moléculas de adesão do tipo integrinas (CD11a, CD18) no lavado da cavidade pleural, no sangue total e em tecidos de animais com pleurisia. No modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, cuja resolução completa é observada 100 horas após a administração do agente flogístico na cavidade pleural (SALEH et al., 1996), alterações paralelas nos leucócitos sanguíneos, caracterizadas por uma diminuição significativa dos seus níveis, foram observadas entre 4 e 48 horas (resultados não apresentados).

Estudos em diversos modelos experimentais vêm demonstrando que o complexo glicoprotéico CD11a/CD18 expresso em vários tipos de leucócitos é importante para a migração celular no sítio do processo inflamatório (KILGORE et al., 1998). Este complexo interage com as moléculas ICAM-1 e ICAM-2 expressas nas células endoteliais promovendo a adesão firme dos leucócitos (MARLIN e SPRINGER, 1987). Estas moléculas de adesão são denominadas de integrinas e fisiologicamente têm baixa afinidade pelo seu ligante. Não são estocadas nos grânulos celulares e sua ativação ocorre por meio da liberação de mediadores químicos, por exemplo, o PAF-acéter, a IL-8 (DIAMOND e SPRINGER, 1994) e as citocinas pró-inflamatórias ou por ativação do fator de transcrição nuclear NF-kappa B. Após o estímulo, ocorre uma mudança conformacional das moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais (PANÉS e GRANGER, 1998) e estas passam a adquirir alta afinidade pelo seu ligante (WALLEY et al., 1996). A partir daí e com a liberação também de fatores quimiotáticos, ocorre a ligação firme entre os leucócitos e o endotélio, permitindo, assim, a migração celular (DANNER et al., 1989; WINDSOR et al., 1993; MURATA et al., 1994;

DOWNEY e HAN, 1998). É importante ressaltar, ainda, que estudos em animais *knockout* ou transgênicos têm demonstrado a importância da expressão de moléculas de adesão em nível fisiológico (JUNG et al., 1998; MIZGERD et al., 1996, 1997; WALZOG et al., 1999). Além disso, a importância biológica das β_2 -integrinas, em humanos deve-se à constatação da doença denominada de deficiência de adesão leucocitária, uma doença autossômica recessiva caracterizada por infecções recorrentes, formação de pus, edema e anormalidades na função de diferentes tipos celulares, como, por exemplo, a migração de granulócitos, monócitos e linfócitos (ANDERSON et al., 1985), liberação de mediadores químicos (LTB₄), por estas células, além da desgranulação celular. Este tipo de doença é atribuída à deficiência na expressão do complexo CD11/CD18, resultado da mutação do gene CD18 (ANDERSON et al., 1985). Além disso, em humanos com deficiência de CD18, constatou-se migração inadequada de neutrófilos para os sítios do processo inflamatório, como intestino e pele, apesar da presença do agente infeccioso (HAWKINS et al., 1992). Em tais condições, todavia, a migração de monócitos e de linfócitos não está comprometida. Já a migração de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar e pulmões, em humanos ocorre via mecanismos independentes de CD18 (HAWKINS et al., 1992). Outros estudos realizados constataram que, de acordo com o órgão afetado ou o estímulo para induzir o processo inflamatório, a migração de neutrófilos para o sítio do processo inflamatório pode ser dependente ou não da expressão do complexo CD11a/CD18 (DOERSCHUK et al., 1990; HELLEWELL et al., 1994; QIN et al., 1996; FLAHERTY et al., 1997).

No presente estudo, nas duas fases (4 e 48 h) do modelo da pleurisia induzida pela carragenina, observou-se aumento significativo de células positivas para CD18 no exsudato, enquanto não foram detectadas alterações estatísticas para o CD11a, em comparação com o grupo-controle. Como a migração de células na primeira fase (4 h) da pleurisia foi predominantemente constituído por neutrófilos, e de acordo com o relato em outros modelos de inflamação, pode-se sugerir que a expressão da molécula de adesão do tipo CD18 exerce papel importante para o influxo daquelas células. Por sua vez, na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória da pleurisia, que ocorre basicamente às custas de mononucleares, é possível sugerir que a migração ocorra também através de mecanismos mediados pelo CD18. Tais constatações estão em acordo com estudos de peritonite induzida pelo tioglicolato (WALZOG et al, 1999), em camundongos deficientes de CD18 (JUNG et al., 1998; WALZOG et al., 1999), bem como em humanos com deficiência da adesão leucocitária tipo 1 (BOWEN et al., 1982). Todavia, MIZGERD et al. (1997), utilizando a mesma cepa de camundongos deficientes de CD18, não observaram alteração significativa da migração de leucócitos, em comparação com o grupo-controle, no mesmo protocolo de peritonite induzida por tioglicolato estudado por WALZOG et al (1999). O conjunto destes resultados permite sugerir, portanto, que a resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de camundongos é mediada pela expressão de leucócitos CD18 positivos.

Embora tenha ocorrido diminuição dos leucócitos circulantes em animais portadores de pleurisia, os resultados da medida do extravasamento

de azul de Evans em pulmões e baços dos animais indicam que, neste modelo, não ocorre aumento da permeabilidade vascular à distância.

Devido à presença de diferentes tipos celulares no pulmão, avaliados pelo método de citometria de fluxo (resultados não apresentados), associada às limitações do presente protocolo experimental, em que não se dispunha de marcador para neutrófilos maduros, a análise da migração destas células ficou prejudicada. Todavia, em que pese os achados negativos de permeabilidade vascular no pulmão de animais com pleurisia, células positivas para CD18, mas não para CD11a, foram detectadas neste órgão, nas duas fases da resposta inflamatória (4 e 48 h).

Embora já tenha sido descrito, em trabalhos anteriores, que a resposta inflamatória do tipo bifásico (4 e 48 h) induzida pela carragenina, na cavidade pleural de camundongos seja de caráter reversível, os resultados do presente trabalho sugerem que o mesmo não é acompanhado de resposta inflamatória sistêmica. Além disso, neste modelo experimental, a migração, tanto de neutrófilos como de mononucleares, parece ser dependente da expressão da molécula CD18 e independente da CD11a.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, indicam:

A participação dos seguintes mediadores e/ou mecanismos na resposta inflamatória induzida pela carragenina, na cavidade pleural de camundongos

- a) NO, uma vez que: *i*) observou-se aumento das concentrações de nitrito/nitrato, 4 e 48 h após a indução da pleurisia; *ii*) inibidores específicos da enzima NO-sintase: L-NOARG e L-NAME inibiram a migração celular e o exsudato da primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina.
- b) Mieloperoxidase, constatando-se aumento nos níveis desta enzima 4 e 6 h após a indução da pleurisia.
- c) Bradicinina, com a ativação de seus receptores do tipo B₂, uma vez que, antagonistas seletivos peptídicos (HOE 140 e NPC 17731) e não-peptídico (NPC 18884) foram eficientes em inibir tanto a migração celular como a exsudação da resposta inflamatória induzida pela carragenina (4 h).
- d) Prostaglandinas, pois inibidores não-seletivos da via da ciclooxigenase (indometacina, meloxicam, nabumetona e dexametasona) inibiram a resposta inflamatória estudada.
- e) Histamina, constatando-se que a terfenadina (antagonista do receptor H₁ da histamina) reduziu o número de leucócitos (4 e 48 h) e a exsudação (48 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina.

- f) Citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-8) e antiinflamatórias (IL-6, IL-10), com base nos resultados de que tanto anticorpos-policlonais como citocinas-recombinantes, administrados diretamente na cavidade pleural juntamente com a carragenina, reproduziram parcialmente seus efeitos pró-inflamatórios ou antiinflamatórios. Além disso, a diacereína (reductor do número de receptores para a IL-1) inibiu significativamente a pleurisia induzida pela carragenina 4 h.
- g) Fator de transcrição nuclear NF- κ B, pois inibidores desta via (PDTC e sulfasalazina) foram eficazes em inibir a resposta inflamatória induzida pela carragenina (4 h). Além disso, a associação de doses subliminares de drogas antiinflamatórias e dos inibidores (PDTC ou sulfasalazina) que isoladamente não foram eficazes, quando associados, mostraram efeito antiinflamatório sineráístico, inibindo tanto a migração celular como a exsudação na pleurisia induzida pela carragenina (4 h).
- h) Moléculas de adesão do tipo CD18, constatando-se aumento da expressão de células CD18 positivas, na cavidade pleural e no pulmão, na primeira fase (4 h) da resposta inflamatória induzida pela carragenina.
- i) Neste modelo experimental, não se observou resposta inflamatória sistêmica caracterizada por aumento da permeabilidade vascular nos pulmões e no baço, em que se pese o aumento da molécula de adesão CD18 em células pulmonares. Contudo, a migração celular de mononucleares e de neutrófilos é dependente da expressão de moléculas CD18 e não CD11a.
- j) Analisados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo confirmam e ampliam os conhecimentos existentes em relação a participação de

mediadores inflamatórios, como as cininas, as citocinas, as moléculas de adesão, além do fator de transcrição nuclear NF- κ B e de enzimas como a mieloperoxidase e a óxido nítrico sintase na resposta inflamatória induzida pela carragenina, no modelo da pleurisia, em camundongos.

K) O uso deste modelo experimental portanto, pode ser útil para o estudo de drogas com potencial atividade antiinflamatória

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, J. The complement system. In: Cellular and Molecular Immunology. ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, J (eds), Philadelphia: WB. Saunders Company, pp: 260-281, 1991a.
- ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, J. Cytokines. In: Cellular and Molecular Immunology. ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, J (eds), Philadelphia: WB. Saunders Company, pp: 226-242, 1991b.
- ADCOCK, IM; BROWN, CR; KWON, OJ; BARNES, PJ. Oxidative stress induces NF- κ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**: 1518-1524, 1994.
- ADMAS, DH; LLOYD, AR. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, **249**: 490-495, 1997.
- AKBARY, AM; WIRTH, KJ; SCHOLKENS, BA. Efficacy and tolerability of icatibant (HOE 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology*, **33**: 238-242, 1996.
- ALBELDA, SM; BUCK, CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASB J.*, **4**: 2868-2880, 1990.
- AL-MUGHHALES, J; BLYTH, TH; HUNTER, JA; WILKINSON, PC. The chemoattractant activity of rheumatoid synovial fluid for human lymphocytes is due to multiple cytokines. *Clin. Exp. Immunol.*, **106**: 230-236, 1996.
- ANDERRSON, DC; SCHMALSTIEG, FC; SHEARER, W; BECKER, FK; KOHL, S; SMITH, CW; TOSI, MF; SPRINGER, T. Leukocyte LFA-1, OKM 1, p150, 95 deficiency syndrome: functional and biosynthetic studies of three kindreds. *Fed. Proc.*, **44**: 2671-2677, 1985.
- ANDUS, T; DAIG, R. ASCHENBRENNER, E; VOLGI, D; SCHÖLMEIRICH, C; GROSS, V. Pro-and anti-inflammatory cytokines in the colonic mucosa. *Gastroenterology*, **108**: 770-774, 1995.
- AREND, WP. Interleukin 1 receptor antagonist a new member of the interleukin 1 family. *J. Clin. Invest.*, **88**: 1445-1451, 1991.
- AREND, WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immun.*, **54**: 167-227, 1993.
- ASANO, K; CHEE, CBE; GASTON, B; LILLY, CM; GERARD, C; DRAZEN, JM; STAMLER, JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10089-10093, 1994.

- AUBRY, JP; DUGAS, N; LECOANET-HENCHOZ, S; HENCHOZ, S; OUAZ, F; ZHAO, H; DELFRAISSY, JF; GRABER, P; KOLB, JP; DUGAS, B; BONNEFOY, JY. The 25-kDa soluble CD23 activates type III constitutive nitric oxide-synthase activity via CD11b and CD11c expressed by human monocytes. *J. Immunol.*, **159**: 614-622, 1997.
- AUPHAN, N; DIDONATO, JA; ROSETTE, C; HEIMBERG, A; KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids inhibition of NF- κ B activity through induction of NF- κ B synthesis. *Science*, **270**: 286-290, 1995.
- AUSTIN, CE; FOREMAN, JC; SCADDING, GK. Reduction by HOE 140, the B₂ kinin receptor antagonist, of antigen-induced nasal blockage. *Br. J. Pharmacol.*, **111**: 969-971, 1994.
- AVONTUUR, JA; BUJIK, SL; BRUINING, HA. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **54**: 627-631, 1998.
- BAEUERLE, PA. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochem. Biophys. Acta*, **1072**: 63-80, 1991.
- BAEUERLE, PA; HENKEL, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**: 141-179, 1994.
- BAGGIOLINI, M; DEWALD, B; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.*, **55**: 55-97, 1994.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392**: 565-567, 1998.
- BALDWIN, AS. The NF- κ B and I- κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**: 649-681, 1996.
- BARNES, PJ; CHUNG, KF; PAGE, CP. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol. Rev.*, **40**: 49-84, 1988.
- BARNES, PJ. Bradykinin and asthma. *Thorax*, **47**: 979-983, 1992a.
- BARNES, PJ. New aspects of asthma. *Inter. Med.*, **231**: 453-461, 1992b.
- BARNES, PJ; BELVISI, MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, **48**: 1034-1043, 1993.
- BARNES, PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann. Med.* **27**: 389-393, 1995.
- BARNES, PJ. Pathophysiology of asthma. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**: 3-10, 1996a.

- BARNES, PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*, **51**: 218-220, 1996b.
- BARNES, PJ. Nuclear factor- κ B. *Int. J. Biochem.*, **29**: 867-870, 1997.
- BARNES, PJ; KARIN, M. Nuclear factor-B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, **336**: 1066-1071, 1997.
- BARNES, PJ. Nuclear factor-Kappa B. *Int. Biochem. Cell*, **29**: 867-870, 1998.
- BARNES, PJ; CHUNG, KF; PAGE, CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* **50**: 515-596, 1998.
- BASBAUM, AI; LEVINE, JD. The contribution of the nervous system to inflammation and inflammatory disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**: 647-651, 1991.
- BATHON, JM; PROUD, D. Bradykinin antagonists. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **31**: 129-162, 1991.
- BAUMAN, H; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunology Today*, **15**: 74-80, 1994.
- BEAUBIEN, BC; COLLINS, PD; JOSE, PJ; TOTTY, NF; HUSUAN, J; WATERFIELD, MD; WILLIAMS, TJ. A novel neutrophil chemoattractant generated during an inflammatory reaction in the rabbit peritoneal cavity *in vivo*: purification, partial amino acid sequence and structural relationship to interleukin-8. *Biochem. J.*, **271**: 797-801, 1990.
- BECK, G; HABICHT, GS; BENACH, JL; MILLER, F. Interleukin-1: a common endogenous mediator of inflammation and local Shwartzman reaction. *J. Immunol.*, **136**: 3025-3031, 1986.
- BELLA, RE; FITZGERALD, MJ; FAUSTO, N; SONENSHEIN, GE. Inhibition of NF- κ B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am. J. Pathol.*, **151**: 891-896, 1997.
- BENSEN, W; ZIZZO, A. Newer, safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. Rational NSAID selection for arthritis. *Can. Fam. Physician*, **44**: 101-102, 1998.
- BERNAREGGI, M; MITCHELL, JA; BARNES, PJ; BELVISI, M. Dual action of nitric oxide on airway plasma leakage. *Am. Resp. Care Med.*, **155**: 869-874, 1997.
- BERTRAND, C; NADEL, JA; YAMAWAKI, I; GEPPETTI, P. Role of kinins in the vascular extravasation evoked by antigen and mediated by tachykinins in guinea pig trachea. *J. Immunol.*, **151**: 4902-4907, 1993.

- BEUTLER, B; GRAU, G. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit. Care Med.*, **21**: 423-434, 1993.
- BEUTLER, B; VAN HUFFEL, C. An evolutionary and functional approach to the TNF receptor/ligand family. *Ann. NY Acad. Sci.*, **730**: 118-133, 1994.
- BEVILACQUA, MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann. Rev. Immunol.*, **11**: 767-804, 1993.
- BHOOLA, KD; FIGUEROA, CD; WORTHY, K. Bioregulation of kinins, kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**: 1-80, 1992.
- BISGAAR, H; FOR-HUTCHINSON; CHARLESON, S; TAUDORF, E. Production of leukotrienes in human skin and conjunctival mucosa after allergen challenge. *Allergy*, **40**: 417-423, 1985.
- BLACKWELL, TS; BLACKWELL, TR; HOLDEN, EP; CHRISTMAN, BW; CHRISTMAN, JW. *In vivo* antioxidant treatment suppresses nuclear factor- κ B activation and neutrophilic lung inflammation. *J. Immunol.*, **157**: 1630-1637, 1996.
- BOGDAN, C; VODOVOTZ, Y; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin-10. *J. Exp. Med.*, **174**: 1549-1555, 1991.
- BOGDAN, C; PAIK, J; VODOVOTZ, Y; NATHAN, C. Contrasting mechanisms for supression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. *J. Biol. Chem.*, **267**: 23301-23308, 1992.
- BÖHRER, H; NAWROTH, PP. Nuclear factor κ B- a new therapeutic approach? *Intensive Care Med.*, **24**: 1129-1130, 1998.
- BOUÉ, F. Cytokines et syndrome inflammatoire. In: Cytokines et médecine interne. GALANAUD, P; ÉMILE, D (eds), Paris: Masson, pp: 133-140, 1997.
- BOWEN, TJ; OCHS, HD; ALTMAN, LC; PRICE, TH; VAN EPPS, DE; BRAUTIGAN, DL; ROSIN, RE; PERKINS, WD; BABIOR, BM; KLEBANOFF, SJ; WEDGWOOD. Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein. *J. Pediatr.*, **101**: 932-940, 1982.
- BOXER, LA. Distúrbios da função dos neutrófilos. In: Cecil Tratado de Medicina Interna. BENNETT, JC e PLUM, F (eds), Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, pp: 1101-1003, 1997.
- BOYLAN, AM; RUEGG, C; KIM, KJ; HEBERT, CA; HOFFEL, JM; PYTELA, R; SHEPPARD, D; GOLDSTEIN, IM; BROADDUS, VC.

- Evidence of a role for mesothelial cell-derived interleukin-8 in the pathogenesis of asbestos-induced pleurisy in rabbits. *J. Clin. Invest.*, **89**: 1257-1267, 1992.
- BOYLAN, AM; HEBERT, CA; SADICK, M; WONG, WL; CHUNTHARAPAI, A; HOFFEL, JM; HARTIALA, KT; BROADDUS, VC. Interleukin-8 is a major component of pleural liquid chemotactic activity in a rabbit model of endotoxin pleurisy. *Am. J. Physiol.*, **267**: 137-144, 1994.
- BRANDOLINI, L; SERGI, R; CASELL, IG; BORASCHI, D; LOCATI, M; SOZZANI, S; BERTINI, R. Interleukin-1 beta primes interleukin-8-stimulated chemotaxis and elastase release in human neutrophils via its type I receptor. *Eur. Cytokine Netw*, **8**: 172-178, 1997.
- BROADDUS, VC; HEBERT, C; VITANGCOL, RB; HOFFEL, JM; BERNSTEIN, MS; BOYLAN, AM. Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor in pleural liquid of patients with empyema. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **146**: 825-830, 1992.
- BROADDUS, VC; HEBERT, CA. Neutralization of interleukin-8 *in vivo* models of lung and pleural injury. *Methods Enzymol.*, **288**: 161-181, 1997.
- BROOKS, J; MIZEL, SB. Interleukin-1 signal transduction (Review). *Eur. Cytokine Netw*, **5**: 547-561, 1994.
- BURCH, RM; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**: 6374-6378, 1987.
- BURCH, RM; DEHAAS, C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenin oedema in rats. *Naunyn Schmied Arch. Pharmacol.*, **342**: 189-193, 1990.
- BURCH, RM; FARMER, SG; STERANKA, L. Bradykinin receptor antagonists. *Med. Res. Rev.*, **10**: 237-269, 1990.
- BURCH, R; KYLE, DJ. Recent development in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.*, **50**: 829-838, 1992.
- BURCH, RM, KYLE, DJ; STOREMENN, JM. Transduction of bradykinin signals. In: *Molecular Biology and Pharmacology of Bradykinin Receptors*. BURCH, RM (ed), Austin: Landes Co, pp: 107-112, 1993.
- BURCKART, GJ; FRYE, RF; KELLY, P; BRANCH, RA; JAIN, A; FUNG, JJ; STARZL, TE; VENKATARAMANAN, R. Induction of CYP2E1 activity in liver transplant patients as measured by chlorzoxazone 6-hydroxylation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **63**: 296-302, 1998.

- BURET, A; DUNKLEY, M; PANG, G; CLANCY, R; CRIPPS, A. Pulmonary immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in intestinally immunized rats: roles of alveolar macrophages tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 alpha. *Infect. Immun.*, **62**: 5335-5343, 1994.
- BUSSE, R; MÜLSCH, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, **275**: 87-90, 1990.
- BUSSOLINO, F; CAMUSSI, G; BAGLIONI, C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 α . *J. Biol. Chem.*, **263**: 11856- 11861, 1988.
- CADIEUX, A; MONAST, NP; POMERLEAU, A; LANONUE, C. Bronchoprotector properties of calcitonin gene-related peptide in guinea pig and human airways. Effect of pulmonary inflammation. *Am. J. Respir. Care Med.*, **159**: 235-243, 1999.
- CAIRNS, J; WALLS, AF. Mast cells tryptase is a mitogen for epithelial cells: stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Immunol.*, **156**: 275-283, 1996.
- CAMP, RDR; COUTTS, AA; GREAVES, MW; KAY, AB; WALPORT, MJ. Responses in human skin to intradermal injections of leukotrienes C₄, D₄, B₄. *Br. J. Pharmacol.*, **80**: 497-502, 1983.
- CARLIN, G; DJURSATER, R; SMEDEGARD, G. Inhibitory effects of sulfasalazine and related compounds on superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes. *Pharmacol. Toxicol.*, **65**: 121-127, 1989.
- CARRÉ, PC; MORTENSON, RL; KING, TEJ; NOBLE, PW; SABLE, CL; RICHES, DWH. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **88**: 1802-1810, 1991.
- CARTER, A; MERCHAV, S; SILVIAN-DRAXLER, I; TATARSKY, I. The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, **74**: 424-431, 1990.
- CASSATELLA, MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today*, **16**: 21-26, 1995.
- CHAKRAVARTY, S; MAVUNKEL, BJ; GOEHRING, RR; KYLE, DJ. Novel bradykinin receptor antagonists from a structurally directed non-peptide combinatorial library. *Immunopharmacol.*, **33**: 61-67, 1996.
- CHEN, W; HAVELL, EA; GIGLIOTTI, F; HARMSSEN, AG. Interleukin-6 production in a murine model of *Pneumocystis carini pneumoniae*: relation

- to resistance and inflammatory response. *Infect. Immun.*, **61**: 97-102, 1993.
- CHEN, F; CASTRANOVA, V; SHI, X; DEMERS, LM. New insights the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.*, **45**: 7-17, 1999.
- CLAIR, S. Nitric oxide-friend or foe in arthritis. *J. Rheumatol.*, **25**: 1451-1453, 1998.
- CLARK, WG. Kinins and the peripheral and central nervous systems. In: Handbook of Experimental Pharmacology. ERDOS, EG (ed), New York: Springer-Verlag, pp: 312-356, 1979.
- COACCIOLI, S; ALLEGRA, A; DI CATO, L; PUXEDDU, A. Clinical efficacy and tolerance of nabumetone in articular and non-articular rheumatic disorders: personal experience during 12 weeks of treatment. *Panminerva Med.*, **40**: 110-115, 1998.
- COLPAERT, FC; DONNERER, J; LEMBERCK, F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissue in rats with adjuvant arthritis. *Life Sci.*, **32**: 1827-1834, 1983.
- CONNER, EM; BRAND, SJ; DAVIS, JM; KANG, DY; GRISHAM, MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel diseases: toxins. Mediators and modulators of gene expression. *Inflam. Bowel Dis.*, **2**: 133-147, 1996.
- CORBETT, JA; MIKHAEL, A; SHIMIZU, J; FREDERICK, K; MISKO, TP; MCDANIEL, ML; KANAGAWA, O; UNANUE, ER. Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine-sensitive and resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 8992-8995, 1993.
- CORRÊA, CR; CALIXTO, JB. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* **110**: 193-198, 1993.
- COSTELLO, AH; HARGREAVES, KM. Suppression of carrageenan-induced hyperalgesia, hyperthermia and oedema by bradykinin antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **171**: 259-263, 1989.
- COTRAN, RI; KUMAR, Z; ROBBINS, SL. Inflamação e reparo. In: Robbins Patologia Estrutural e funcional. COTRAN, RI; KUMAR, Z; ROBBINS, SL (eds), Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, pp: 39-86, 1996.
- COTRAN, RS; MAYADAS-NORTON, T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol. Biol.*, **46**: 164-170, 1998.

- CRAMER, EB. Cell Biology of phagocyte migration from the bone marrow, out of the bloodstream, and across organ epithelia. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. GALLIN, JI; GOLDSTEIN, IM; SNYDERMAN, R (eds), New York: Raven Press, Ltd., pp: 341-349, 1992.
- CRETICOS, PS; PETERS, SP; ADKINSON, NF; NACLERIO, RM; HAYES, EC; NORMAN, PS; LCHTENSTEIN, LM. Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed. *New Engl. J. Med.*, **310**: 1626-1630, 1984.
- CROFFORD, LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.*, **24**: 15-19, 1997.
- CUSH, JJ; SPLAWSKI, JB; THOMAS, R; MACFARLIN, JE; SHULZE-KOOPS, H; DAVIS, LS; FUJITA, K; LIPSKY, PE. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.*, **38**: 96-104, 1995.
- CYBULSKY, AV; GOODYER, PR; CYR, MD; MCTAVISH, AJ. Eicosanoids enhance epidermal growth factor receptor activation and proliferation in glomerular epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **262**: 639-646, 1992.
- D'ACQUISTO, F; IUVONE, T; ROMBOLÁ, L; SAUTEBIN, L; DI ROSA, M; CARNUCIO, R. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett*, **418**: 175-178, 1997.
- D'ACQUISTO, F; IANARO, A; IUVONE, T; COLANTUONI, V; CARNUCCIO, R. Activation of nuclear transcription factor Kappa B in rat carrageenan-induced pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.*, **19**: 233-236, 1999.
- DAMAS, J; BOURDON, V; REMACLE-VOLON, G; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudate induced by carrageenin and zymosan in rats. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 418-422, 1990.
- DANNER, RL; SUFFREDINI, AF; NATHANSON, C. Microbial toxins: role in the pathogenesis of septic shock and multiple organ failure. In: *Multiple organ failure*. BIHARI, DJ; CERRA, FB (eds). California: Society of Critical Care Medicine, pp: 151-191, 1989.
- DAVIS, AJ; KELLY, D; PERKINS, MN. The induction of des-Arg⁹-bradykinin-mediated hyperalgesia in the rat by inflammatory stimuli. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **27**: 1793-1802, 1994.
- DE CAMPOS, ROP; ALVES, RV; KYLE, D; CHAKRAVARTY, S; MAVUNKEL, BJ; CALIXTO, JB. Antioedematogenic and antinoceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **316**: 227-286, 1996.

- DE CAMPOS, RO; ALVES, RV; FERREIRA, J; KYLE, DJ; CHAKRAVARTY, S; MAVUNKEL, BJ; CALIXTO, JB. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.*, **360**: 278-286, 1999.
- DE FOUGEROLLES, AR; STACKER, AS; SCHWARTING, R; SPRINGER, TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *Exp. Med.*, **174**: 253-267, 1991.
- DE WAAL MALEFYT, R; ABRAMS, J; BENNETT, B; FIGDOR, CG; DE VRIES, JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokines synthesis by human monocytes: an auto regulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* **179**: 1209-1220, 1991.
- DE WAAL MALEFYT, R; YSSEL, H; RONCAROLO, MG; SPITS, H; DE VRIES, J. Interleukin-10. *Curr. Opin. Immunol.*, **4**: 314-320, 1992.
- DEBLOIS, D; BOUTHILIER, J; MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, **93**: 969-977, 1988.
- DEBLOIS, D; BOUTHILIER, J; MARCEAU, F. Pharmacological modulation of the up-regulated responses to des-Arg⁹-bradykinin *in vivo* and *in vitro*. *Immunopharmacology*, **17**: 187-198, 1989.
- DEL POZO, V; DE ARRUDA-CHAVES, E; DE ANDRES, B; CARDABA, B; LOPEZ-FARRE, A; GALLARDO, S; CORTEGANO, I; VIDARTE, L; JURADO, A; SASTRE, J; PALOMINO, P; LAHOZ, C. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* **158**: 859-864, 1997.
- DENIS, M; CORMIER, Y; FOURNIET, M; TARDIF, J; LAVIOLETTE, M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **5**: 477-483, 1991a.
- DENIS, M; CORMIER, Y; TARDIF, E; GHARDIRIAN, E; LAVIOLETTE, M. Hypersensitivity pneumonitis: whole *Micropolyspora faeni* or antigens there of stimulate the release of proinflammatory cytokines from macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **5**: 198-203, 1991b.
- DI ROSA, M; IALENTI, A; IANARO, A; SAUTEBIN, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins Leukoc. Essent. Fatty Acids.*, **54**: 229-238, 1996.
- DIAMOND, MS; STAUNTON, DE; DE FOUGEROLLES, AR; STACKER, AS; GARCIA-AGUIAR, J; HIBBS, ML; SPRINGER, TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.*, **111**: 3129-3139, 1990.

- DIAMOND, MS; SPRINGER, TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol.*, **4**: 506-507, 1994.
- DIMITRIADOU, V; BUZZI, MG; THEOHARIDESS, TC; MOSKOWITZ, MA. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neuroscience*, **48**: 187-203, 1992.
- DINARELLO, CA. Interleukin-1. *Rev. Infec. Dis.*, **6**: 51-95, 1984a.
- DINARELLO, CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N. Engl. J. Med.*, **311**: 1413-1418, 1984b.
- DINARELLO, CA. Biology of interleukin-1. *FASEB J.*, **2**: 108-115, 1988a.
- DINARELLO, CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. *Int. Rev. Immunol.*, **16**: 457-499, 1988b.
- DINARELLO, CA. Interleukin-1. *Ann. NY Acad. Sci.*, **546**: 122-132, 1988c.
- DINARELLO, CA; OKUSAWA, S; GELFAND, JA. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits: synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **286**: 243-263, 1989.
- DINARELLO, CA; CANNON, JG; MANCILLA, J; BISHAI, I; LEES, J; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.*, **562**: 199-206, 1991.
- DINARELLO, CA. Interleukin-1. *Adv. Pharmacol.*, **25**: 21-51, 1994.
- DOERSCHUK, CM; WINN, K; COXSON, HO; HARLAN, JM; FLAHERTY, SF; GOLENBOCK, DT; MILHAN, FH; INGALES, RR. CD18-dependent and independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. *J. Immunol.*, **144**: 2327-2333, 1990.
- DONNELLY, SC; STRIETER, RM; REID, PT; KUNKEL, SL; BURDICK, MD; ARMSTRONG, I; MACKENZIE, A; HASLETT, C. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *Ann. Intern. Med.*, **125**: 191-196, 1996.
- DORSCH, WJ; RING, PC; WEBER, PC; STRASSER, T. Detection of immunoreactive leukotriene LTC₄/LTD₄ in skin-blister fluid allergen testing in patients with late cutaneous reactions (LCR). *Arch. Dermatol. Res.*, **277**: 400-401, 1985.
- DOUGADOS, M; COMBE, B; CANTAGREL, A; GOUPILLE, P; OLIVE, P; SCHATTEKIRCHNER, M; MEUSSER, S; PAIMELA, L; RAU, R;

- ZEIDLER, H; LEIRISALO-REPO, M; PELDAN. Combination therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised, controlled, double blind 52 week clinical trial of sulphasalazine and methotrexate compared with the single components. *Ann. Rheum. Dis.*, **58**: 220-225, 1999.
- DOWNEY, JS; HAN, J. Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front. Biosci.*, **3**: 468-476, 1998.
- DOZEN, M; YAMAKI, K; OH-ISHI. Captopril uncovers kinin-dependent release of arachidonic acid metabolites in carrageenin-induced rat pleurisy. *JPN. J. Pharmacol.*, **51**: 101-105, 1989.
- DRAY, A; BEVAN, S. Inflammation and hiperalgesia: highlighting the team effort. *Trends Pharmacol. Sci.*; **14**: 287-290, 1993.
- DRAY, A; PERKINS, MN. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Pharmacol. Neurosci.*, **16**: 99-104, 1993.
- DRAY, D; URBAN, L; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**: 190-197, 1994.
- DRAZEN, JM; AUSTEN, KF; LEWIS, RA; CLARK, DA; GOTO, G; MARFAT, A; COREY, J. Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D *in vivo* and *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 4354-4358, 1980.
- DUBOIS, RN, ABRAMSON, B, CROFFORD, L, GUPTA, RA, SIMON, LS, VAN DE PUTTE, LBA, LIPSKY, PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.*, **12**: 1063-1073, 1998.
- DUMONT, A; HEHNER, SP; SCHMITZ, ML; GUSTAFSSON, JA; LIDDÉN, J; OKRET, S; VAN-DER-SAAG, PT; WISSINK, S; VAN DER BURG, B; HERRLICH, P; HAEGEMAN, G; BOSSCHIER, K; FIERIS, W. Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language? *Trend of Pharmacol.*, **23**: 233-235, 1998.
- DUSANTER-FOURT, I; MAYEUX, P; GISSELBRECHT, S. Transduction du signal par les récepteurs de cytokines. *Médecine-Sciences*, **10**: 825-842, 1994.
- DUSTIN, ML; SPRINGER, TA. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **107**: 321-331, 1988.
- EDAMITSU, S; MATSUKAWA, A; OKAWARA, S; TAKAGI, K; NARIUCHI, H; YOSHINAGA, M. Role of TNF alpha, IL-1, and IL-1ra in the mediation of leukocyte infiltration and increased vascular permeability in rabbits with LPS-induced pleurisy. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **75**: 68-74, 1995.

- EHRlich, LC; HU, SHUXIAN; PETERSON, PK; CHAO, CC. IL-10 down-regulates human microglial IL-8 by inhibition of NF- κ B activation. *Neuroreport.*, **9**: 1723-1726, 1998.
- EISENBERG, SP; EVANS, RJ; AREND WP; VERDERBER, E; BREWER, MT; HANNUM, CH; THOMPSON, RC. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, **343**: 341-346, 1990.
- EISERICH, JP; HRISTOVA, M; CROSS, CE; JONES, AD; FREEMAN, BA; HALLIWELL, B; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*: **391**: 393-397, 1998.
- ELICES, MJ; OSBORN, L; TAKADA, Y; CROUSEE, C; LWHOWSKYJ, S; HEMLER, ME; LOBB, RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, **60**: 577-584, 1990.
- ERTEL, W; MORRISON, MH; WANG, P; BA, ZF; AYALA, A; CHAUDRY, IH. The complex pattern of cytokines in sepsis. Association between prostaglandins, cachectin, and interleukins., *Ann. Surg.*, **214**: 141-148, 1991.
- ETZIONI, A. Adhesion molecules-their role in health and disease. *Pediatr. Res.*, **39**: 191-198, 1996.
- EVILEVITCH, V; WU, TT; LINDGREN, L; GREIFF, L; NORRGREN, K; WOLLMERM P. Time course of the inflammatory response to histamine and allergen skin prick test in guinea-pigs. *Acta Physiol. Scand.*, **165**: 409-513, 1999.
- FARRELL, AJ; BLAKE, DR; PALMER, RMJ; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrate in synovial fluid and serum samples suggest increase nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, **51**: 1219-1222, 1992.
- FIELD, JL; HALL, JM; MORTON, IKM. Putative novel bradykinin B₃ receptor in the smooth muscle of the guinea pig taenia caeci and trachea. *Agents Actions Suppl.*, **38**: 540-545, 1992.
- FIorentino, DF; ZLOTNIK, A; MOSMANN, TR; HOWARD, M; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, **147**: 3815-3822, 1991.
- FISCHER, A; MUNDEL, P; MAYER, B; PREISLER, U; PHILIPPIN, B; KUMMER, W. Nitric oxide synthase in guinea-pig lower airway innervation. *Neurosci. Lett*, **149**: 157-160, 1993.

- FLAHERTY, SF; GOLENBOCK, DT; MILHAM, FH; INGALLS, RR. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signalling receptors for bacterial endotoxin. *J. Surg. Res.*, **73**: 85-89, 1997.
- FLORY, CM; JONES, ML; MILLER, BF; WARREN, JS. Regulatory roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. *Am. J. Pathol.*, **146**: 450-462, 1995.
- FLYN, JL; GOLDSTEIN, MM; CHAN, J; TRIEBOLD, KJ; PFEFFER, K; LOWEISTEIN, CJ; SCHREIBER, R; MAK, T; BLOOM, BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, **2**: 561-572, 1995.
- FÖRSTEMANN, U; NAKANE, M; TRACEY, WT; POLLOCK, JS. Isoform of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur. Heart J.*, **14**: 10-15, 1993.
- FOX, AJ; BARNES, PJ; URBAN, L; DRAY, A. An *in vivo* study of the properties of single vagal afferents innervating guinea pig airways. *J. Physiol.*, **469**: 21-35, 1993.
- FRENETTE, PS; WAGNER, DD. Adhesion Molecules- Part I. *New England J. Med.*, **335**: 43-45, 1996a.
- FRENETTE, PS; WAGNER, DD. Adhesion Molecules- Part II. *New England J. Med.*, **334**: 1526-1529, 1996b.
- FRÖDE-SALEH, TS; CALIXTO, JB; MEDEIROS, YS. Effect of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, **20**: 949-956, 1999.
- FUKUMOTO, T; MATSUKAWA, A; YOSHIMURA, T; EDAMITSU, S; OHKAWARA, S; TAKAGI, K; YOHINAGA, M. IL-8 is an essential mediator of the increased delayed-phase vascular permeability in LPS-induced rabbit pleurisy. *J. Leukoc. Biol.*, **63**: 584-590, 1998.
- GADANGI, P; LONGAKER, M; NAIME, D; RECHT, PA; MONTESINOS, MC; BUCKLEY, MT; CARLIN, G; CRONSTEIN, BN. The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J. Immunol.*, **156**: 1937-1941, 1996.
- GAGINELLA, TS; WALSH, RE. Sufasalazine: multiplicity of action. *Dis. Sci.*, **37**: 801-812, 1992.
- GALANAUD, P. Les cytokines du système de défense. In: Cytokines et médecine interne. GALANAUD, P; ÉMILE, D (eds), Paris: Masson, pp:1-255, 1997.
- GALLI, S.J. New concepts about the mast cell. *New Engl. J. Med.*, **328**: 257-265, 1993.

- GARSDIE, P; HUTTON, AK; SEVERN, A; LIEW, FY; MOWAT, A. Nitric oxide mediates intestinal pathology in graf-vs-host disease. *Eur. J. Immunol.*, **22**: 2141-2145, 1992.
- GASTON, B; DRAZEN, JM; LOSCALZO, J; STAMLER, JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**: 538-551, 1994.
- GEPPETTI, P; BERTRAND, C; RICCIARDOLO, ML; NADEL, JA. New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. *Can. J. Pharmacol.*, **73**: 843-847, 1995.
- GHOSH, S; MAY, MJ; KOPP, EB. NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**: 225-260, 1998.
- GIAID, A; SALEH, D; LIM, S; BARNES, PJ; ERNST, P. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J.*, **12**: 929-937, 1998.
- GIARDIELLO, FM; HAMILTON, SR; KRUSH, AJ; PIANTADOSI, S; HYLIND, LM; CELANO, P; BOOKER, SV; ROBINSON, CR; OFFERHAUS, GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.*, **328**: 1313-1316, 1993.
- GIONCHETTI, P; GUARNIERI, M; CAMPIERI, A; BELLUSGI, C; BRIGNOLA, P; TANNONE, M; MIGLIOLI, M; BARBARA, C. Scavenger effect of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid, and osalazine on superoxide radical generation. *Dig. Dis. Sci.*, **36**: 174-178, 1991.
- GIOVANNUCCI, E; RIMM, EB; STAMPFER, MJ; COLDITZ, GA; ASCHERIO, A; WILLETT, WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann. Intern. Med.*, **121**: 241-246, 1994.
- GODBAY, AVB; KUNKEL, SL; HOTT, JW; HARTMAN, DL; BURDICK, MD; STRIETER, RM. Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines IL-8 and MCP-1 in human pleural fluids. *J. Immunol.*, **151**: 7216-7223, 1993.
- GOLDSTEIN, RH; WALL, MJ. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin. *Clin. Chem.*, **259**: 9263-9268, 1984.
- GOSSELIN, D; DESANCTIS, J; BOULE, M; SKAMENE, C; MATOUK, C; RADZIOCH, D. Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, **63**: 3272-3278, 1995.

- GREAVES, M.; SHUSTER, S. Responses of skin blood vessels to bradykinin, histamine and 5-hydroxytryptamine. *J. Physiol.*, **193**: 255-267, 1967.
- GREEN, IC; WAGNER, DA; GLOWSKI, J; SKIPPER, PL; WISHNOK, JS; TANNENBAUM, SB. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**: 131-138, 1982.
- GREIFF, L; WOLLMER, P; ANDERSSON, M; SVENSSON, C; PERSSON, CG. Effects of formoterol on histamine induced plasma exudation in induced sputum from normal subjects. *Thorax*, **53**: 1010-1013, 1998.
- GRILLI, M; CHIU, JJ; LEONARDO, M. NF- κ B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.*, **143**: 1-62, 1993.
- GRISHAM, MB. Role of reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **9**: 971-980, 1993.
- GRISHAM, MB. NF- κ B activation in acute pancreatitis: protective detrimental or inconsequential. *Gastroenterology*, **116**: 489-492, 1999.
- GROSS, SS; LEVI, R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **267**: 25722-25729, 1992.
- GUO, FH; DE RAEVE, HR; RICE TW, STUEHR, DJ; THUNNISSEN, FB; ERZURUM SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7809-7813, 1995.
- HAAGSMA, CJ; BLOM, HJ; VAN RIEL, PL; VAN'T HOF, MA; GIESENDORF, BA; VAN OPPENRAAIJ-EMMEZAAL, D. Influence of sulfasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **58**: 79-84, 1999.
- HAANEN, C; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. In: Mediators of inflammation. HAANEN, C; VERMES, I (eds), Oxford, London: Rapid Communications of Oxford Ltd., pp: 5-15, 1995.
- HAJJAR, DP; LANDER, HM; PEARCE, FS. UPMACIS RK; POMERANZ, KB. Nitric oxide enhances prostaglandin-H-synthase activity by a heme-independent mechanisms: evidence implicating nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 3340-3346, 1995.
- HALL, JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190, 1992.
- HALL, JM. Bradykinin receptors. *Gen. Pharmacol.*, **28**: 1-6, 1997.

- HALL, J; MORTON, IKM. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. The Kinin system. In: Handbook of Immunopharmacology. FARMER, SG (ed), London: The Academic Press, pp: 9-43, 1997.
- HAMBERG, U; VAHTERA, E; MOILANEN, L. Functionally active alpha 2-macroglobulin and kinin release in synovial fluids of rheumatoid arthritis. *Agents Actions*, **8**: 50-56, 1978.
- HAMID, Q; SPRINGALL, DR; RIVEROS-MORENO, V; CHANEZ P; HOWARTH, P; REDINGTON, A; BOUSQUET, J; GODARD, P; HOLGATE, S; POLAK, J. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, **342**: 1510-1513, 1993.
- HANNUM, CH; WILCOX, CJ; AREND, WP; JOSLIN, FG; DRIPPS, DJ; HEIMDAL, PL; ARMES, LG; SOMMER, A; EISENBERG, SP; THOMPSON, RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*, **343**: 336-340, 1990.
- HARADA, A; SEKITO, N; AKAHOSHI, T; WADA, T; MUKAIDA, N; MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, **56**: 559-564, 1994.
- HASKILL, S; MARTIN, G; VAN LE, L; MORRIS, J; PEACE, A; BIGLER, CF; JAFFE, GJ; HAMMERBERG, C; SPORN, AS; FONG, S. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin-1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 3681-3685, 1991.
- HAWKINS, EP; HEFFELFINGER, SC; ANDERSON, DC. Leukocyte adhesion deficiency: clinical and post-mortem observations. *Pediatr. Pathol.*, **12**: 119-130, 1992.
- HAYHOE, FGJ; FLEMAN, RJ. Técnicas de coloração. In: Um atlas Colorido de Citologia Hematológica. HAYHOE, FGJ, FLEMAN, RJ (eds). Rio de Janeiro, Brazil: Artes Médicas, pp: 378, 1995.
- HELLEWEL, PG. Cell adhesion molecules and potential for pharmacological intervention in lung inflammation. *Pulm. Pharmacol.*, **6**: 109-118, 1993.
- HELLEWELL, PG; YONG, SK; HENSON, PM; WORTHEN, GS; DOERSCHUK, CM; WINN, RK; COXSON, HO; HARLAN, JM; FLAHERTY, SF; GOLENBOCK, DT; MILHAN, FH; INGALES, RR. Disparate role of the β 2-integrin CD18 in the local accumulation of neutrophils in pulmonary and cutaneous inflammation in the rabbit. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **10**: 391-398, 1994.
- HENDERSON, B; POOLE, S. Modulation of cytokines function: therapeutic application. *Adv. Pharmacol.*, **25**: 53-115, 1994.
- HENDERSON, B; POOLE, S; WILSON, M. Microbial/host interactions in

- health and disease: who controls the cytokine network? *Immunopharmacology*, **35**: 1-21, 1996.
- HENRIQUES, MG; WEG, VB; MARTINS, MA; SILVA, PMR; FERNANDES, PD.; CORDEIRO, RSB.; VARGAFTIG, BB. Differential inhibition by two tetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 164-168, 1990.
- HENRIQUES, MG. Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos. Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Tese de doutorado, pp: 1-181, 1993.
- HENRIQUES, GM; MIOTLA, JM; CORDEIRO, SB; WOLITZKY, BA; WOOLLEY, ST; HELLEWELL, PG. Selectins mediate eosinophil recruitment *in vivo*: a comparison with their role in neutrophil influx. *Blood*, **87**: 5297-5304, 1996.
- HILLIQUIN, P; BORDERIE, D; HERNVANN, A; MENKES, CJ; EKINDIJAN, OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **40**: 1512-1517, 1997.
- HISCOTT, J; MAROIS, J; GAROUFALIS, J; D'ADDARIO, M; ROULSTON, A; KWAN, I; PEPIN, N; LACOSTE, J; NGUYEN, H; BENSI, G; FENTON, M. Characterization of a functional NF-Kappa B site in the human interleukin-1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell Biol.*, **13**: 6231-6240, 1993.
- HOCK, FJ; WIRTH, K; ALBUS, U; LINZ, W; GERHARDS, HJ; WIEMER, G; HENKE, S; BREIPOHL, G; KONIG, W; KNOLLE, J; SCHOLKENS, BA. HOE 140, a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 769-773, 1991.
- HOLTMANN, H; WALLACH, D. Down regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin 1 and 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate. *J. Immunol.*, **139**: 1161-1167, 1987.
- HOWARD, M; O'GARRA, A; ISHIDA, H; DE WAAL MALEFYT, R; DE VRIES J. Biological properties of interleukin 10. *J. Clin. Immunol.*, **12**: 239-247, 1992.
- HOWARD, M; MIYAJIMA, A; COFFMAN, R. T cell-derived cytokines and their receptors. In: Fundamental Immunology, WILLIAN EP (ed), New York: Raven Press, Ltd, pp: 763-800, 1993a.
- HOWARD, M; MUCHAMUEL, T; ANDRADE, S; MENON, S. Interleukin-10 protects mice from lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.*, **177**: 1205-1208, 1993b.

- IADEMARCO, MF; MCQUILLAN, JJ; ROSEN, GD; DEAN, DC. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.*, **267**: 16323-16329, 1992.
- IALENTI, A; IANARO, A; MONCADA, S; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 177-182, 1992.
- IALENTI, A; MONCADA, S; DI ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 701-706, 1993.
- IANARO, A; O'DONNELL, CA; DI ROSA, M; LIEW, F. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. *Immunology*, **82**: 370-375, 1994.
- ICHINOSE, M; BARNES, PJ. Bradykinin-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction are mediated via bradykinin B₂ receptor. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **142**: 1104-1107, 1990.
- ICHINOSE, M; BELVISI, MG; BARNES, PJ. Bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea pig *in vivo*: role of neural mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**: 594-599, 1990.
- INAMURA, N; ASANO, M; HATORI, C; SAWAI, H; HIROSUMI, T; FUJIWARA, T; KAYAKIRI, H; SATOH, S; ABE, Y; INOUE, T; SAWADA, Y; OKU, T; NAKAHARA, K. Pharmacological characterization of a novel, orally active, non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR167344. *Eur. J. Pharmacol.*, **333**: 79-86, 1997.
- INTERNATIONAL ASTHMA MANAGEMENT PROJECT. International Consensus Report on Diagnosis and Treatment of Asthma. Department of Health and Human Services. Public Health Service Publication. Bethesda: National Institutes of Health, pp: 1-72, 1992.
- ISSEKUTZ, AC; MEAGER, A; OTTERNESS, I; ISSEKUTZ, TB. The role of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 in polymorphonuclear leukocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, **97**: 26-32, 1994.
- JAESCHKE, L. Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am. J. Physiol.*, **273**: 602-611, 1997.
- JANG, D; MURRELL, GA. Nitric oxide in arthritis, *Free Radical Biol. Med.*, **24**: 15-11, 1998.
- JANSSEN, A; COOK, T; TAYLOR, GM; LARGÉN, P; RIVEROS-MORENO, V;

- MONCADA, S; CATTELL, V. Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **45**: 1215-1219, 1994.
- JEZDINSKY, J; HALEK, J. The effects of some analgesic and neuroleptics upon the reflexive and effective components of the formaldehyde-and bradykinin-induced nociceptive reactions in rats. *Activ. Nerv. Sup.*, **16**: 226-228, 1974.
- JORDAN, M; OTTERNESS, IG; NG, R; GESSNER, A; ROLLINGHOFF, M; BEUSCHER, HU. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.*, **15**: 4081-4090, 1995.
- JUE, DM; JEON, KI; JEONG, JY. Nuclear kappa B (NF-Kappa B) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *J. Korean Med. Sci.*, **14**: 231-238, 1999.
- JUNG, U; NORMAN, KE; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K; BEAUDET, AL; LEY, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **102**: 1526-1533, 1998.
- KAMPSCHMIDT, RF; PULLIAM, LA. Effect of human monocyte pyrogen on plasma iron, plasma zinc and blood neutrophils in rabbits and rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**: 32-35, 1978.
- KAWAGUCHI, M; MITSUHASHI, Y; KONDO, S. Acute generalized exanthematous pustulosis induced by salazosulfapyridine in a patient with ulcerative colitis. *J. Dermatol.*, **26**: 359-362, 1999.
- KAWAI, M; NISHIKOMORI, R; JUNG, EY; TAI, G; YAMANAKA, C; MAYUMI, M; HEIKE, T. Pyrrolidinedithiocarbamate inhibits intercellular adhesion molecule-1 biosynthesis induced by cytokines in human fibroblasts. *J. Immunol.*, **154**: 2333-2341, 1995.
- KAY, AB. Th2-type cytokines in asthma. *Ann. NY Acad. Sci.*, **796**: 1-8, 1996.
- KILBOURN, RG; JUBRAN, A; GROSS, SS; GRIFFITH, OW; LEVI, R; ADAMS, J; LODATO, RF. Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**: 1132-1138, 1990.
- KILGORE, KS; WARD, P; WARREN, JS. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: the roles of P-selectin and platelet activating factor. *Inflammation*, **22**: 583-598, 1998.
- KIM, EC; ZHU, Y; ANDERSEN, V; SCIACKY, D; CAO, HJ; MEEKINS, H; SMITH, T; LANCE, P. Cytokines-mediated PGE₂ expression in human colonic fibroblasts. *Am. J. Physiol.*, **275**: 988-994, 1998.

- KISHIMOTO, T; TAGA, T; AKIRA, S. Cytokine signal transduction. *Cell*, **76**: 253-262, 1994.
- KISHIMOTO, T; AKIRA, S; NARAZAKI, M; TAGA, T. Interlukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, **86**: 1243-1254, 1995.
- KLEEMANN, R; ROTHE, H; KOLB-BACHOFEN, V; XIE, Q; NATHAN, C; MARTIN, S; KOLB, H. Transcription and translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic BB rats. *FEBS Lett.*, **328**: 9-12, 1993.
- KOBZIK, L; BREDT, DS; LOWENSTEIN, CJ; DRAZEN, J; GASTON, B; SUGARBAKER, D; STAMLER JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **9**: 371-377, 1993.
- KOLLIAS, G. Tumor necrosis factor: a specific trigger in arthritis. *Res. Immunol.*, **44**: 342-347, 1993.
- KOLLS, J; XIE, J; LEBLANC, R; MALINSKI, T; NELSON, S; SUMMER, W; GREENBERG, SS. Rapid induction of messenger RNA for nitric oxide synthase II in rat neutrophils *in vivo* by endotoxin and its suppression by prednisolone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **205**: 220-225, 1994.
- KONIKOVA, E; GLASOVA, M; KUSENDA, J; BABUSIKOVA, O. Intracellular markers in acute myeloid leukaemia diagnosis. *Neoplasma*, **45**: 282-291, 1998.
- KOPP, E; GHOSH, S. NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.*, **58**: 1-27, 1995.
- KOPROWSKI, H; ZHENG, YM; HEBER-KATZ, E; FRASER, N; RORKE, L; FU, ZF; HANLON, C; DIETZCHOLD, B. *In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 3024- 3027, 1993.
- KOWASLSKI, M; KALINER, MA. Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. *J. Immunol.*, **140**: 3905-3911, 1988.
- KRAWIZ, JE; SHARON, P; STENSON, WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, **87**: 1344-1350; 1984.
- KRISHNASWAMY, G; LIU, MC; SU, SN; KUMAI, M; XIAO, HQ; MARSH, DG; HUANG, SK. Analysis of cytokine transcripts in the bronchoalveolar lavage cells of patients with asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **3**: 279-286, 1993.

- KUIJPERS, TW; HARLAN, JM. Monocyte-endothelial interactions: insights and questions. *J. Lab. Clin. Med.*, **122**: 641-651, 1993.
- KULKARNI, N; ZANG, E; KELLOFF, G; REDDY, B. Effect of the chemopreventive agents piroxicam and D-L- α -difluoromethylornithine on intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **13**: 995-1000, 1992.
- KUNSCH, C; ROSEN, CA. NF-Kappa B subunit specific regulation in the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell Biol.*, **13**: 6137-6146, 1990.
- KUNZ, D; WALKER, G; PFEILSCHIFTER, J. Transforming growth factor- β_2 inhibits interleukin 1 β -induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Inflamm. Res.*, **46**: 327-331, 1997.
- KURONO, Y; HIRONO, T; WATANABE, T; SUZUKI, M; MOGI, G. The role of IL-1 beta in murine model of otitis media with effusion. *Nippon Jibiinkoka Gakai Kaiho*, **101**: 1093-1098, 1998.
- KUSUGAMI, K; FUKATSU, A; TANIMOTO, M; SHINODA, M; HARUTA, J; KUROIWA, A; INA, K; KANAYAMA, K; ANDO, T; MATSUURA, T; YAMAGUCHI, T; MORISE, K; IDEA, M; TOKAWA, H; ISHIHARA, A; SARAI. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage and epithelial cell depends. *Dig. Dis. Sci.*, **40**: 949-959, 1995.
- KWON, OJ; AU, BT; COLLINS, PD; BARANIUK, JN; ADCOCK, IM; CHUNG, KF; BARNES, PJ. Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultures airway epithelial cells. *Immunology*, **81**: 389-394, 1994.
- KWONG, KY; JONES, CA; CAYABYAB, R; LECART, C; STOTTS, CL; RANDHAWA, I; RAMANATHAN, R; KHUU, N; MINOO, P; DELEMOS, RA. Differential regulation of IL-8 by IL-1 beta and TNF alpha in hyaline membrane disease. *J. Clin. Immunol.*, **18**: 71-80, 1998.
- KYLE, DJ; MARTIN, JA; BURCH, RM; CARTER, JP; LU, S; MEEKER, S; PROSSER, JC; SULLIVAN, JP; TOGO, S; NORONHA-BLOB, L; SUNSKO, JA; WALTERS, RF; WAHLEY, LW; HINER, RN. Probing the bradykinin receptor: mapping the bradykinin receptor: mapping the geometric topography using ethers of hydroxyproline in novel peptides. *J. Med. Chem.*, **34**: 2649-2653, 1991.
- LAICHALK, L; KUNKEL, S; STRIETER, J; DANFORTH, J; BAILIE, M; STANDIFORD, T. Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defence in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **64**: 5211-5218, 1996.
- LE ROUIC, JF; ROBIN, H; DOAN, S; PRISANT, O; BELAYACHI, N; HOANG-XUAN, T. Treatment of ocular cicatricial pemphigoid with sulfasalazine. *J. Fr. Ophthalmol.*, **22**: 423-425, 1999.

- LEE, JL; BURCKART, GJ. Nuclear factor Kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.*, **38**: 981-993, 1998.
- LEMBECK, F; HOLZER, P. Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol.*, **310**: 175-183, 1979.
- LEMBECK, F; GRIESBACHER, T; ECKHARDT, M; HENKE, S; BREIPOHL, G; KNOLLE, J. New, long-lasting, potent bradykinin antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 297-304, 1991.
- LEMBECK, F; GRIESBACHER, T; LEGAT, FJ. Lack of significant effects of HOE 140 and other novel bradykinin antagonists *in vitro* and *in vivo*. *Agents Actions*, **38**: 414-422, 1992.
- LENG, W; KUO, CG; QURESHI, R; JAKSCHIK, BA. Role of leukotrienes in vascular changes in the rat mesentery and skin in anaphylaxis. *J. Immunol.*, **140**: 2361-2368, 1988.
- LENTSCH, AB; SHANLEY, TP; SARMA, V; WARD, PA. *In vivo* suppression of NF- κ B and preservation of I κ B α by interleukin-10 and interleukin-13. *J. Clin. Invest.*, **100**: 2443-2448, 1997.
- LEONARDO, MJ; BALTIMORE, D. NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, **58**: 227-229, 1989.
- LEVI, S; GOODLAD, RA; LEE, CY; STAMP, G; WALPORT, MJ; WRIGHT, NA; HODGSON, HJF. Inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mucosa cell proliferation associated with gastric ulcer healing. *Lancet*, **336**: 840-843, 1990.
- LIPPE, IT; STABENTHEINER, A; HOLZER, P. Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. *Eur. J. Pharmacol.*, **232**: 113-120, 1993.
- LIPTAY, S; BACHEM, M; HÄCKER, G; ADLER, G; DEBATIN, KM; SCHMID, RM. Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *B. J. Pharmacol.*, **128**: 1361-1369, 1999.
- LIU, SF; YE, X; MALIK, AB. *In vivo* inhibition of nuclear factor- κ B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J. Immunol.*, **159**: 3976-3983, 1997.
- LIU, L; ZUURBIER, AE; MUL, FP; VERHOEVEN, AJ; LUTTER, R; KNOL, EF; ROOS, D. Triple role of platelet-activating factor in eosinophil migration across monolayers of lung epithelial cells: eosinophil chemoattractant and priming agent and epithelial cell activator. *J. Immunol.*, **161**: 3064-3070, 1998.

- LJUNGGREN, O; LERNER, UH . Evidence for BK₁ bradykinin receptor-mediated prostaglandin formation in osteoblasts and subsequent enhancement of bone reabsorption. *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 382-386, 1990.
- LOMEDICO, PT; GUBLER, U; HELMAN, C; DUKOVICH, M; GIRI, JG; PAN, Y; COLIER, R; SEMIONOW, R; CHUA, AO; MIZEL, SB. Cloning and expression of murine IL-1 cDNA in *E. coli*. *Nature*, **312**: 458-462, 1984.
- LUKACS, NW, STRIETER, RM; CHENSUE, SW; KUNKEL, SC. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophils infiltration in a murine model of asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **10**: 526-532, 1994.
- LUSTER, AD. Mechanisms of disease: chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England J. Med.*, **338**: 436-445, 1998.
- MARLIN, SD; SPRINGER, TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen (LFA-1). *Cell*, **51**: 813-819, 1987
- MCCARTNEY-FRANCIS, M; ALLEN, HB; MIZEL, DE; ALBINA, JE; XIE, QW; NATHAN, CF; WAHL, SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **178**: 749-754, 1993.
- MARKS, JD; MARKS, CB; LUCE, JM; MONTGOMERY, AB; TURNER, J; METZ, CA; MURRAY, JF. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**: 94-97, 1990.
- MAINI, RN; BRENNAN FM, WILLIAMS, R; CHU, CQ; COPE, AP; GIBBONS, D; ELLIOTT, M; FELDMANN, M. TNF α in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **11**: 173-175, 1993.
- MAK, JCW; BARNES, PJ. Autoradiographic visualization of bradykinin receptors in human and guinea pig lung. *Eur. J. Pharmacol.*, **194**: 37-43, 1991.
- MANIATIS, T. Catalysis by a multiprotein I κ B complex. *Science*, **278**: 818-819, 1997.
- MARCEAU, F Kinin B₁ receptor: a review. *Immunopharmacol.*, **30**, 1-26, 1995.
- MARCEAU, F; BARABE, J; ST-PIERRE, S; REGOLI, D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **58**: 536-542, 1980.

- MARCEAU, F; LUSSIER, A; REGOLI, D; GIROUD, JP. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.*, **14**: 209-229, 1983.
- MARGOLIUS, HS. Kallikreins and kinins. *Hypertension*, **26**: 221-229, 1995.
- MARLETTA, MA; YOON, PS; IYENGAR, R; LEAF, CD; WIHNOK, JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate is an intermediate. *Biochemistry*, **27**: 8706-8711, 1988.
- MATSUSHIMA, K; YODOI, J; TAGAYA, Y; OPPENHEIM, JJ. Down-regulation of interleukin 1 (IL 1) receptor expression by IL 1 and rate of internalized 125I-labeled IL 1 beta in a human large granular lymphocyte cell line. *J. Immunol.*, **137**: 3183-3188, 1986.
- MATSUSHIMA, K; MORISHITA, K; YOSHIMURA, T; LAVU, S; KOBAYASHI, W; LEU, W; APPELLA, E; KUNG, HF; LEONARD, EJ; OPPENHEIM, JJ. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **167**: 1883-1893, 1988.
- MATSUKAWA, A; YOSHIMURA, T; MAEDA, T; OHKAWARA, S; TAKAGI, K; YOSHINAGA, M. Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist *in vivo*. *J. Immunol.* **154**: 5418-5425, 1995.
- MATTHEUS, J; BOTING, AU; JOSE, PJ; LIM, S; SAUNDERS, M; BARNES, PJ; MITCHELL, JA; BELVISI, MG; CHUNG, KF. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am. J. Resp. Mol. Biol.*, **18**: 84-90, 1997.
- MAY, MJ. Signal transduction through NK-Kappa B. *Immunol. Today*, **19**: 80-88, 1998.
- MCCALL, TB; PALMER, RMJ; MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur. J. Immunol.*, **21**: 2523-2527, 1991.
- MCCARTNEY-FRANCIS, M; ALLEN, HB; MIZEL, DE; ALBINA, JE; XI, QW; NATHAN, CF; WAHL, SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, **178**: 749-754, 1993.
- MCDONALD, DM; THURSTON, G; BALUK P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*, **6**: 7-22, 1999.
- MCGREGOR, J; BERDEAUX, A; BONNET, J; CAMBIEN, F; FITZGERALD, D; LACOLLEY, P; LU, H; LE SAUX NARJOZ, A; MIOSSEC, P; NETTER, P; POSTON, R; LAURENT, S. Cell adhesion molecules and pharmacologic applications. Round table N° 3 at Giens XIII. *Therapie*, **53**: 371-379, 1998.

- MCINTYRE, TM; MODUR, V; PRESCOTT, SM; ZIMMERMAN, GA. Molecular mechanisms of early inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, **78**: 302-305, 1997.
- MCMURRAY, RW. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin. Arthritis Rheum.*, **25**: 215-233, 1996.
- MELMON, KL; WEBSTER, ME; GOLDFINGER, SE; SEEGMILLER, JE. The presence of a kinin in inflammatory synovial effusion from arthritis of varying etiologies. *Art. Rheum.*, **10**: 13-20, 1967.
- MEYER, M; SCHRECK, R; BAEUERLE, PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidants-responsive factor. *EMBO J.*, **12**: 2005-2015, 1993.
- MILLER, EJ; IDELL, S. Interleukin-8: an important neutrophil chemotaxin in some cases of exudative pleural effusions. *Exp. Lung Res.*, **19**: 589-601, 1990.
- MILLER, EJ; COHEN, AB; NAGAO, S; GRIFFITH, D; MAUNDER, RJ; MARTIN, TR; WIENER-KRONISH, JP; STICHERLING, M; CHRISTOPHERS, E; MATTHAY, MA. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **146**: 427-432, 1992.
- MIURA, M; BELVISI, MG; BARNES, PJ. Effect of bradykinin in airway neural responses *in vitro*. *J. Appl. Physiol.*, **73**: 1537-1541, 1992.
- MIYAMOTO, K; MATSUKAWA, A; OHKAWARA, S; TAKAGI, K; YOSHINAGA, M. IL-8 involved in homologous TNF-alpha, but not in IL-1 beta-induced neutrophil infiltration in rabbits. *Inflamm. Res.*, **46**: 742-747, 1997.
- MIYASAKA, N; HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritis. *Life Science*, **61**: 2073-2081, 1997.
- MIZGERD, JP; QUINLAN, WM; LEBLANC, BW; KUTKOSKI, GJ; BULLARD, DC; BEAUDET, AL; DOERSCHUK, CM. Combinatorial requirements for adhesion molecules in mediating neutrophil emigration during bacterial peritonitis in mice. *J. Leukoc. Biol.*, **64**: 291-297, 1996.
- MIZGERD, JP; KUBO, H; KUTKOSKI, GJ; BHAGWAN, SD; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K; BEAUDET, AL; DOERSHUK, CM. Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **186**: 1357-1364, 1997.

- MIZOBUCHI, M; IWASAKI, Y. Adhesion molecules and immune-mediated diseases of the central nervous system. *Nippon Rinsho*, **52**: 2830-2836, 1994.
- MOHLER, KM; TORRANCE, DS; SMITH, CA; GOODWIN, RG; STREMLER, KE; FUNG, VP; MADANI, HM; WIDMER, MB. Soluble tumor necrosis (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.*, **151**: 1548-1561, 1993.
- MONCADA, S; PALMER, RMJ; HIGGS, AE. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol., Rev.*, **43**: 109-142, 1991.
- MORRIS, SM; BILLIAR, TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, **266**: 829-839, 1994.
- MOSSMAN, TR; CHEWINSKI, H; BOND, MW; GIEDLIN, MA; COFFMAN, RL. Two types of murine helper T cell clone 1. Definitin according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, **136**: 23-48, 1986.
- MÜLLER, JM; ZIEGLER HEIBROCK, HWL; BAEUERLE, PA. Nuclear factor Kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology*, **187**: 233-256, 1993.
- MULLIGAN, MS; JONES, ML; BOLANOWSKI, MA; BAGANOFF, MP; DEPPELER, CL; MEYER, DM; RYAN, US; WARD, PA. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.*, **150**: 5585-5595, 1993.
- MURATA, A; TODA, H; UDA, K; HAYASHIDA, H; KATO, T; NAKAGAWA, H; YOKOYAMA, S; MORISHITA, H; YAMAKAWA, T; HIROSE, J. Protective effect of recombinant neutrophil elastase inhibitor (R-020) on sepsis-induced organ injury in rat. *Inflammation.*, **18**: 337-347, 1994.
- MUZIO, M; POLENTARUTTI, N; SIRONI, M; POLI, G; DE GIOIA, L; INTRONA, M; MANTOVANI, A; COLOTTA, F. Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. *J. Exp. Med.*, **182**: 623-628, 1995.
- NAKAMURA, H; YOSHIMURA, K; JAFFE, HÁ; CRYSTAL, RG. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19611-19617, 1991.
- NATHAN, C; XIE, Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **269**: 13725-13728, 1994.

- NAWROTH, BH. Nuclear factor kappa B-a new therapeutic approach? *Intensive Care Med.*, **24**: 1129-1130, 1998.
- NEEDLEMAN, P, ISAKSON, PC. The discovery and function of COX-2. *J. Rheum.*, **24**: 6-8, 1997.
- NEISH, AS; WILLIAMS, AJ; PALMER, HJ; WHITLEY, MZ; COLLINS, T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule-1 promoter. *J. Exp. Med.*, **176**: 1583-1593, 1992.
- NÉMETH, Z; HASKÓ, G; VIZI, S. Pyrrolidinedithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF- α , MIP-1 α , and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin. *Shock*, **10**: 49-53, 1998.
- NEWTON, R; KUITERT, LM; BERGMANN, M; ADCOCK, IM; BARNES, PJ. Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, **237**: 28-32, 1997.
- O'BYRNE, PM. Airway inflammation and asthma. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **2**: 18-24, 1996.
- O'GARRA, A; CHANG, R; GO, N; HASTINGS, R; HAUGHTON, G; HOWARD, M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.*, **22**: 711-717, 1992.
- OHLSSON, K; BJORK, P; BERGENFELDT, M; HAGEMAN, R; THOMPSON, RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*, **348**: 550-552, 1990.
- O'NEIL, GP; FORD-HUTCHINSON, AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, **330**: 156-160, 1993.
- O'DELL, JR; MOORE, GF; KLASSEN, LW. Combination therapy in rheumatoid arthritis: a comment. *Rheumatology*, **38**: 577, 1999.
- OKADA, S; KITA, H; GEORGE, TJ; GLEICH, GJ; LEIFERMAN, KM. Transmigration of eosinophils through basement membrane components *in vitro*: synergistic effects of platelet-activating factor and eosinophil-active cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **16**: 455-463, 1997.
- O'RIORDAIN, MG; O'RIORDAIN, DS; MOLLOY, RG; MANNICK, JA; RODRICK, ML. Dosage and timing of anti-TNF-alpha antibody treatment determine its effect of resistance to sepsis after injury. *J. Surg. Res.*, **64**: 95-101, 1996.
- OSWALD, IP; WYNN, TA; SHER, A; JAMES, L. Interleukin inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogene production of

- tumor necrosis factor alpha required as a costimulate factor for interferon gamma-induced activation. *Proc. Natl. Acad. USA*, **89**: 8676-8680, 1992.
- PALACIOS, M; KNOWLES, RG, PALMER, RMJ; MONCADA, S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 802-809, 1989.
- PALMER, RMJ; FERRIGE, AG; MONCADA, S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526, 1987.
- PANÉS, J; GRANGER, DN. Leukocyte-endothelial cell interations: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*, **114**: 1066-1090, 1998.
- PARK, CS; CHOI, YS; KI, SY; MOON, SH; JEONG, SW; UH, ST; KIM, YH. Cytokines enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **150**: 59-62, 1994.
- PEREIRA, CAC; SOLÉ, D. Consenso Brasileiro no manejo da asma. Sociedade Brasileira de Pneumologia, Pediatria, Alergia e Imunopatologia. *J. Pneumo.*, **24**: 171-231, 1998.
- PERKINS, MN; CAMPBELL, E; DRAY, A. Anti-nociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-Arg⁹, [leu⁸]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain*, **53**: 191-197, 1993.
- PERRETTI, M; SOLITO, E; PARENTE, L. Evidence that endogenous interleukin-1 is involved in leukocyte migration in acute experimental inflammation in rats and mice. *Agents Actions*, **35**: 71-78, 1992.
- PERRETTI, M, APPLETON, I, PARENTE, L, FLOWER, RJ. Pharmacology of interleukin-1-induced neutrophil migration. *Agents actions*, **38**: 64-65, 1993.
- PESQUERO, JB; BADER, MJB. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**: 1197-1203, 1998.
- PETROS, A; BENNETT, D; VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, **338**: 1557-1558, 1991.
- PEVERI, P; WALZ, A; DEWALD, B; BAGGIOLINI, M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, **167**: 1547-1559, 1988.

- PILEWSKI, J; ALBELDA, SM. Adhesion molecules in the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **148**: 531-537, 1993
- PINKUS, R; WEINER, LM; DANIEL, V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappa B, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.*, **271**: 13422-13429, 1996.
- PIZZO, PA. O hospedeiro comprometido. In: Cecil Tratado de Medicina Interna BENNETT, JC e PLUM, F (eds), Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, pp: 1701, 1997
- PONGRACIC, JA; CHURCHILL, L; PROUD, D. kinin in rhinitis. In: bradykinin antagonists. Basic and Clinical research. BURCH, RM (ed), New York: Marcel Decker, pp: 237-259, 1991.
- POOLE, S; CUNHA, FQ; SELNIK, S; LORENZETTI, BB; FERREIRA, SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 684-688, 1995.
- PROUD, D. The kinin system in rhinitis and asthma. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **16**: 351-364, 1998.
- PULLMAN, WE; ELSBURY, S; KOBAYASHI, M; HAPPEL, AJ; DOE, WF. Enhanced mucosa cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **81**: 301-305, 1992.
- QIN, L; QUINLAN, W; DOYLE, N; GRAHAM, L; SLIGH, J; FUMIO, T; BEAUDET, R; DOERSCHUK, C. The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in mice. *J. Immunol.*, **157**: 5016-5021, 1996.
- QIU, HB; CHEN, DC; PAN, JQ; LIU, DW; MA, S. Inhibitory effects of nitric oxide and interleukin-10 on production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 in mouse alveolar macrophages. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, **20**: 271-275, 1999.
- RAFEUL, A. Update on cells and cytokines. Chemokines in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**: 273-277, 1998.
- RAIDOO, D; BHOOLA, KD. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol. Ther.*, **79**: 103-127, 1998.
- RAINER, GE; BUCKLEY, CD; SIMMONS, DL; NASH, GB. Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through alphaVbeta3-integrin. *Am. J. Physiol.*, **276**: 858-864, 1999.
- RAO, TS; CURRIE, JL; SHAFFER, AF; ISAKSON, PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, **17**: 723-741, 1993.

- REGOLI, D; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Review*, **32**: 1-46, 1980.
- REINECKER, HC; STEFFEN, M; WITHOEFT, T; PFLUEGER, I; SCHREIBER, S; MACDERMOTT, RP; RAEDLER, A. Enhanced secretion of tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclears cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **94**: 174-181, 1994.
- REYNOLDS, WF; RHEES, J; MACIEJEWSKI, D; PALADINO, T; SIEBURG, H; MAKI, RA; MASLIAH, E. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.*, **155**: 31-41, 1999.
- RIBEIRO, RA; FLORES, CA; CUNHA, FQ; FERREIRA, SH. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by cell-dependent mechanisms. *Immunology*, **73**: 472-477, 1991.
- RICHMAN-EISENSTAT, JB; JORENS, PG; HÉBERT, CA; UEKI, I; NADEL, JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am. J. Physiol.*, **264**: 413-418, 1993.
- ROBBINS, RA; BARNES, PJ; SPRINGALL, DR; WARREN, JB; KWON, OJ; BUTTERY, LDK; WILSON, AJ; GELLER, DA; POLAK, JM. Expression of inducible nitric oxide synthase in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**: 209-218, 1994.
- ROCHA E SILVA, MO. Brief history of inflammation. In: Handbook of Experimental Pharmacology. VANE, JR; FERREIRA SH (eds), New York: Springer-Verlag, pp: 6-25, 1978.
- ROGLER, G; BRAND, K; VOGL, D; PAGE, S; HOFMEISTER, R; ANDUS, T; KNUECHEL, R; BAEUERLE, A; SCHOLMERICH, J; GROSS, V. Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, **115**: 357-369, 1998.
- ROMAGNANI, S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr. Opin. Immunol.*, **6**: 838-846, 1994
- SAKAMOTO, T; ELWOOD, W; BARNES, PJ; CHUNG, KF. Effect of HOE 140, a new bradykinin antagonist, on bradykinin and platelet-activating factor-induced bronchoconstrictions and airway microvascular leakage in guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.*, **213**: 376-373, 1992.
- SAKAMOTO, T; TSUKAGOSHI, H; BARNES, PJ; CHUNG, KF. Role played by NK₂ receptor and cyclooxygenase activation in bradykinin B₂ receptor mediated-airway effects in guinea pigs. *Agents Actions*, **39**: 111-117, 1993.

- SAKURAI, H; HISADA, Y; UENO, M; SUGIURA, M; KAWASHIMA, K; SUGITA, T. Activation of transcription factor NF- κ B in experimental glomerulonephritis in rats. *Biochem. Biophys. Acta*, **1316**: 132-138, 1996.
- SAKURATA, S; KATO, T; OKAMOTO, T. Induction of cytokines and ICAM-1 by proinflammatory cytokines in primary rheumatoid synovial fibroblasts and inhibition by N-acetyl-L-cysteine and aspirin. *Int. Immunol.*, **8**: 1483-1493, 1996.
- SALEH, TSF, CALIXTO, JB, MEDEIROS, YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 811-819, 1996.
- SALEH, TSF; CALIXTO, JB; MEDEIROS, YS. Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.*, **331**: 43-52, 1997.
- SALEH, TSF; VIANNA, RMJ; CRECZYNSKI-PASA, TB; CHAKRAVARTY, BJM; KYLE, DJ; CALIXTO, JB. Oral-anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **363**: 179-187, 1998.
- SALVEMINI, D; DE NUCCI, G; GRYGLEWSKI, R; VANE, JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Acad. Sci. USA*, **86**: 6328-6332, 1989.
- SALVEMINI, D; MANNING, PT; ZWEIFEL, BS; SEIBERT, K; CONNOR, MG; NEEDLEMAN, P; MASFERRER, JL. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the anti-inflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J. Clin. Invest.*, **96**: 301-308, 1995.
- SAUTEBIN, L; DI ROSA, M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **262**: 193-196, 1994.
- SAUTEBIN, LA; IALENTI, A; IANARO, A; DI ROSA, M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 323-328, 1995.
- SAUTEBIN, L; IALENTI, A; IANARO, A; DI ROSA, M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. *Bioch. Pharmacol.*, **55**: 1113-1117, 1998.
- SCHADLICH, H; ERMANN, J; BISKOP, M; FALK, W; SPERLING, F; JUNGEL, A; LEHMANN, J; EMMRICH, F; SACK, U. Anti-inflammatory effects of systemic anti-tumor necrosis factor alpha treatment in human/murine SCID arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **58**: 428-434, 1999.

- SCHEINMAN, RI; COGSWELL, PC; LOFQUIST, AK; BADWIN, AS. Role of transcriptional activation by I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**: 283-286, 1995.
- SCHERRER, D; DAEFFLER, L; TRIFILIEFF, A; GIES, JP. Effects of WIN 64338, a non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, on guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1127-1128, 1995.
- SCHLEIMER, RP; STERBINSKY, AS; KAISER, J; BICKEL, CA; KLUM, DA; TOMIOKA, K; NEWMAN, W; GIMBRONE, MA; MCINTYRE, BW. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.*, **148**: 1086-1092, 1992.
- SCHLOZ, W. Interleukin-6: cause or cure. *Immunopharmacology*, **31**: 131-150, 1996.
- SCHRECK, R; RIEBER, P; BAEUERLE, PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, **10**: 2247-2258, 1991.
- SCHREIBER, S; HEINIG, T; THIELE, HG; RAEDLER, A. A immunoregulatory role of interleukin-10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **108**: 1434-1444, 1995.
- SCHREIBER, S; NIKOLAUS, S; HAMPE, J. Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut*, **42**: 477-484, 1998.
- SCHRODER, J. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J. Exp. Med.*, **170**: 847-863, 1989.
- SCHROTH, M. Adhesion molecules in asthma and allergy. *Mol. Biol. Allergy Immunol.*, **16**: 643-657, 1996.
- SCHUILING, M; ZUIDHOF, AB; ZAAGSMA, J; MEURS, H. Involvement of tachykinin NK₁ receptor in the development of allergen-induced airway hyperreactivity and airway inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am. J. Respir. Care Med.*, **159**: 423-430, 1999.
- 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, pp: 27-47, 1985.
- SEDIVA, A; BARTUNKOVA, J; KOLAROVA, I; HRUSAK, O; VAVROVA, V; MACEK, M; LOCKWOOD, CM; DUNN, AC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in children with cystic fibrosis. *J. Autoimmun.*, **11**: 185-190, 1998a.

- SEDIVA, A; KOLAROVA, I; BARTUNKOVA, J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children, *Eur. J. Pediatr.* **57**: 987-991, 1998b.
- SEITZ, M; DEWALD, B; GERBER, N; BAGGIOLINI, M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, **87**: 463-469, 1991.
- SEM, R; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**: 705-716, 1986.
- SHAKHOV, NA; COLLART, MA; VASSALI, P; NEDOSPASOV, As; JONGENEEL, CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.*, **171**: 35-47, 1990.
- SHANLEY, TP; WARNER, RL; WARD, PA. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol. Med. Today*, **1**: 40-45, 1995.
- SHARMA, JN; ZEITHLIN, IJ; DEODHAR, SD; BUCHANAN, WW. Detection of kallikrein-like activity in inflamed synovial tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **262**: 279-286, 1983.
- SHELHAMER, JH; LEVINE, SJ; WU, T; JACOBY, DB; KALINER, MA; RENNARD, SI. Airway Inflammation. *Ann. Int. Med.*, **123**: 288-304, 1995.
- SHIN, DI; BANNING, U; KIM, YM; VERHEYEN, J; HANNEN, M; BONIG, H; KORHOLZ, D. Interleukin 10 inhibits TNF-alpha production in human monocytes independently of interleukin 12 and interleukin 1 beta. *Immunol. Invest.*, **28**: 165-175, 1999.
- SIEBENLIST, U; FRANZOSO, G; BROWN, R. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann. Ver. Cell Biol.*, **10**: 405-455, 1994.
- SIMMS, JE; DOWER, SK. Interleukin-1 receptors (Review). *Eur. Cytokine Netw*, **5**: 539-546, 1994.
- SIRONI, M; BREVIARIO, F; PROSERPIO, P; BIONDI, A; VECCHI, A; DAMME, JV; DEJANA, E; MANTOVANI, A. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.*, **142**: 549- 553, 1989.
- SKERRETT, SJ; MARTIN, TR; CHI, EY; PESCHON, JJ; MOHLER, KM; WILSON, CB. Role of the type 1 TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol.*, **276**: 715-727, 1999.
- SMITH, CH; BARKER, JN; LEE, TH. Adhesion molecules in allergic

- inflammation. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **148**: S75-S78, 1993.
- SMITH, JA; WEBB, C; HOLFORD, J; BURGESS, GM. Signal transduction pathways for B₁ and B₂ bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.*, **47**: 525-534, 1995.
- SMITH, S; SKERRETT, SJ; CHI, EY; JONAS, M; MOHLER, K; WILSON, CB. The locus of tumor necrosis factor- α action in lung inflammation. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **19**: 881-891, 1998.
- SMOLEN, JE; BOXER, LA. Function of granulocytes. In: Hematology. WILLIAMS WJ, BEUTLER, E; ERSLEV, AJ (eds), New York: MCGraw-Hill, pp: 779-990, 1994.
- SONODA, F; OIHI, K; IWAGAKI, A; MATSUMOTO, K. Endogenous tumor necrosis factor (TNF)- α mediates neutrophil accumulation at the mid phase of a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Microbiol. Immunol.*, **41**: 601-608, 1997.
- SPERTINI, O; LUCINSKAS, FM; KANSAS, GS; MUNRO, JM; GRIFFIN, JD; GIMBRONE, MA; TEDDA, TF. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.*, **147**: 2565- 2573, 1991.
- SPERTINI, O; LUSCINSKAS, FW; GIMBRONE, MA; TEDDER, TF JR. Monocyte attachment to activated human vascular endothelium *in vitro* is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J. Exp. Med.*, **175**: 1789-1792, 1992.
- STANDIFORD, TJ; KUNKEL, SL; BASHA, MA; CHENSUE, SW; LYNCH, JP; TOEWS, GB; WESTWICK, J; STRITER, RM. Interleukin-8 gene expression by pulmonary epithelial cell line: a model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.*, **86**: 1945-1953, 1990.
- STANDIFORD, TJ; KUNKEL, SL; LIBLER, JM; BURDICK, MD; GILBERT, AR; STRIETER, RM. Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 α from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **9**: 192-198, 1993a.
- STANDIFORD, TJ; KUNKEL, SL; STRIETER, RM. Interleukin-8: a major mediator of acute pulmonary inflammation. *Reg. Immunol.*, **5**: 134-141, 1993b.
- STANDIFORD, TJ; STRIETER, RM; LUKACS, NW; KUNKEL, SL. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia: cooperative effect of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, **155**: 2222-2229, 1995.

- STANDIFORD, TJ; KUNKEL, SL; GREENBERGER, MJ; LAICHALK, LL; STRIETER, RM. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J. leukoc. Biol.*, **59**: 24-28, 1996.
- STEFANOVIC-RACIC, M; MEYERS, K; MESCHTER, C; COFFEY, JW; HOFFMAN, RA; EVANS, CH. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum.*, **37**: 1062-1069, 1994.
- STEIN, B; SUTHERLAND, MSK IL-6 as a drug discovery target. *Therapeutic focus*, **3**: 202-213, 1998.
- STERANKA, LR; BURCH, RM. Bradykinin antagonists in pain and in inflammation, In: Bradykinin Antagonists: Basic Clinical Research. BURCH, RM (ed), New York: Marcel Decker, pp: 171-189, 1991.
- STEVENS, C; WALZ, G; SINGARAM, C; LIPMAN, ML; ZANKER, B; MUGGIA, A; ANTONIOLI, D; PEPPERCORN, MA; STROM, TB. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.*, **37**: 818-826, 1992.
- STOSSEL, TP. On the crawling of animal cells. *Science*, **160**: 1086-1094, 1993.
- STRITER, RM; KUNKEL, SL; SHOWELL, HJ; REMICK, DJ; PHAN, SH; WARD, PA; MARKS, RM. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF α , LPS and IL-1 β . *Science*, **243**: 1467-1469, 1989.
- STRIETER, R; KUNKEL. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **42**: 640-651, 1994.
- STUEHR, DJ; GROSS, SS; SAKUMA, I; LEVI, R; NATHAN, CF. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **169**: 1011-1020, 1989.
- SUBRAMANIAN, N; BRAY, MA. Interleukin-1 releases histamine from human basophils and mast cells *in vitro*. *J. Immunol.*, **138**: 271-275, 1987.
- SUTER, PM; SUTER, S; GIRARDIN, E; ROUX LOMBARD, P; GARU, GE; DAYER, JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon and elastase in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma shock or sepsis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**: 1016-1022, 1992.
- SUTTLES, J; CARRUTH, LM; MIZEL, SB. Detection of IL-1 alpha and IL-1 beta in the supernatants of paraformaldehyde-treated human monocytes. Evidence against a membrane form of IL-1. *J. Immunol.*, **144**: 170-174, 1990a.

- SUTTLES, J; GIRI, JG; MIZEL, SB. IL-1 secretion by macrophages. *J. Immunol.*, **144**: 175-182, 1990b.
- SYMON, FA; WALSH, GM; WATSON, SR; WARDLAW. Eosinophil adhesion to nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. *J. Exp. Med.* **180**: 371-376, 1994.
- TAKASHIMA, K; TATEDA, K; MATSUMOTO, T; LIZAWA, Y; NAKAO, M; YAMAGUCHI, K. Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infect. Immun.*, **65**: 257-260, 1997.
- TAKEDA, T; NAIKI, Y; YONEKAWA, S; SAKAGUCHI, M; IWAMOTO, I; TANAKA, H; HASEGAWA, H; IMADA, A; KANAMARU, A; HIRUMA, S; MAEKURA, S; HASHIMOTO, S; YAMAZUMI, T. An experience of treatment of double positive myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) and anti-glomerular basement membrane antibodies in Goodpasture's syndrome onset of crescentic glomerulonephritis. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, **40**: 591-596, 1998.
- TALBOT, SF; ARKINS, PC; GOETZL, EJ; ZWEIMAN, B. Accumulation of leukotriene C₄ and histamine in human allergic skin reactions. *J. Clin. Invest.*, **76**: 650, 1985.
- TEIXEIRA, MM; WELL, TNC; LUKACS, NW; PROUDFOOT, AEI; KUNKEL, SL; WILLIAMS, TJ; HELLEWELL, PG. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an *in vivo* allergy model in mouse skin. *J. Clin. Invest.*, **100**: 1657-1666, 1999.
- TERAN, L; JOHNSTON, L; SCRÖDER, JM; CHURCH, M; HOLGATE, S. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am. J. Resp. Care Med.*, **155**: 1362-1366, 1997.
- TETSUKA T, BAIER LD, MORRISON AR. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, **271**: 11689-11693, 1996.
- THELEN, M; DEWALD, B; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.*, **73**: 797-821, 1993.
- THUN, MJ; NAMBOODIRI, MM; HEATH, CW. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. Med.*, **325**: 1593-1596, 1991.
- TIKU, K; TIKU, ML; SKOSEY, JL. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.*, **136**: 3677-3685, 1986.
- TOMLINSON, A; APLETON, I; MOORE, AR; GILROY, DW; WILLIS, D; MITCHELL, JA; WILLOUGHBY, DA. Cyclooxygenase and nitric oxide

- synthase isoforms in rat carrageenan-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol.* **113**: 693-698, 1994.
- TRACEY, WR; NAKANE, M; KUK, J; BUDZIK, G; KLINGHOFER, V; HARRIS, R; CARTER, G. The nitric oxide synthase inhibitor, L-n⁹-monomethylarginine, reduces carrageenan-induced pleurisy in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**: 1295-1299; 1995.
- TRIFILIEFF, A; HADDAD, EB; LANDRY, Y; GIES, PJ. Evidence for two high-affinity bradykinin binding sites in the guinea pig lung. *Eur. J. Pharmacol.*, **207**:129-206, 1991.
- UENO, A.; TAKANA, K; KATORI, M; HAYASHI, M; ARAI, Y. Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotriene C₄ and D₄. *Prostaglandins*, **21**: 637- 656, 1981.
- ULICH, TR; DEL CASTILLO, J; KEYS, M; GRANGER, GA; NI, RX. Kinetics and mechanisms of recombinant human IL-1 and TNF α -induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes. *J. Immunol.*, **139**: 3406-3415, 1987.
- ULICH, TR; DEL CASTILLO, J; NI, RX; BIKHAZI, N; CALVIN, L. Mechanisms of TNF-induced lymphopenia, neutropenia, and biphasic neutrophilia. *J. Leukoc. Biol.*, **45**: 155-167, 1989.
- ULICH, TR; SONGMEI, Y; GUO, K; DEL CASTILLO, J; EISENBERG, SP; THOMPSON, C. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin-and-IL-1-induced acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, **138**: 521-524, 1991a.
- ULICH, TR; DEL CASTILLO, J; REMICK, D; GUO, K; YIN, S; WENG, P. Endotoxin-induced cytokine gene expression and the *in vivo* hematologic effects of IL-6. *J. Immunol.*, **146**: 2316-2323, 1991b.
- ULICH, TR; WATSON, LR; SONGMEI, Y; GUO, K; WANG, P; THANG, H; DEL CASTILLO, J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. *Am. J. Pathol.*, **138**: 1485-1496, 1991c.
- UTSUNOMIYA, I; NAGAI, S; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. *J. Immunol.*, **147**: 1803-1809, 1991.
- UTSUNOMIYA, I; ITO, M; OH-ISHI, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CIBC) *in vivo*. *Cytokine*, **10**: 956-963, 1998.
- VAN ZEE, KJ; KOHNO, T; FISCHER, E; ROCK, C; MOLDAWER, LL; LOWRY, SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 4845-4849, 1992.

- VAN DE LOO, FA; JOOSTEN, LA; VAN LENT, PL; ARNTZ, OJ; VAN DEN BERG, WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of *in situ* blocking in murine antigen-and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **38**: 164-172, 1995a.
- VAN DE LOO, FA; ARNSZ, OJ; BAKKER, AC; VAN LENT, PL; JACOBS, MJ; VAN DEN BERG, WB. Role of interleukin-1 in antigen-induced exacerbations of murine arthritis. *Am. J. Pathol.*, **146**: 239-249, 1995b.
- VAN DEN HEUVEL, MM; SMIT, HJM; BARBIERATO, SB; HAVENITH, CEG; BEELEN, RHJ; POSTMUS, PE. Talc-induced inflammation in the pleural cavity. *Eur. Resp. J.*, **12**: 1419-1423, 1998.
- VAN DER POLL, T; MARCHANT, A; BUURMAN, WA; BERMAN, L; KEOGH, CV; NGUYEN, L; GOLDMAN, M; MOLDAWER, L; LOWRY, SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J. Immunol.*, **155**: 5397-5401, 1995.
- VAN DER POLL, T; JANSEN, PM; MONTEGUT, WJ; BRAXTON, CC; CALVANO, SE; STACKPOLE, AS; SMITH, SR; SWANSON, SW; HACK, CE; LOWRY, SF; MOLDAWER, LL. Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. *J. Immunol.*, **158**: 1971-1975, 1997.
- VAN HUFFEL, C; DUBOIS, E; MESSENGUY, F. Cloning and sequencing of *Schizosaccharomyces pombe* car1 gene encoding arginase. Expression of the arginine anabolic and catabolic genes in response to arginine and related metabolites. *East*, **10**: 923-933, 1994.
- VAN LENT, PL; VAN DE LOO, FA; HOLTHUYSEN, AE; VAN DEN BERSSELAAR, LA; VERMEER, H; VAN DEN BERG, WB. Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J. Rheumatol.*, **22**: 2250-2258, 1995.
- VANE, JR, BOTTING, RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.*, **47**: 78-87, 1998a.
- VANE, JR, BOTTING, RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.*, **30**:2-8 1998b.
- VANE, JR; BAKHLE, YS; BOTTING, RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**: 97-120, 1998.
- VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**: 411-452, 1992.
- VIANNA, RM, CALIXTO, JB. Characterisation of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-bradykinin in mouse pleurisy. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 281-291, 1998.

- VIDELA, S; GARCIA-LAFUENTE, A; ANTOLIN, M; VILASECA, J; GUARNER, F; CRESPO, E; GONZALES, G; SALAS, A; MALAGELADA, JR. Anti-tumor necrosis factor therapy in rat chronic granulomatous colitis: critical dose-timing effects on outcome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**: 854-859, 1998.
- WADDELL, WR; GASNER, GF; CERISE, EJ; LOUGHRY, RW. Sulindac for polyposis of the colon. *Am. J. Surg.*, **157**: 175-178, 1989.
- WAHL, C; LIPTAY, S; ADLER, G; SCHMID, RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa *Br. J. Clin. Invest.*, **101**: 1163-1174, 1998.
- WALLACE, J; ADCOCK, IM; BARNES, PJ. Retinoic acid potentiates the inhibitory effects of dexamethasone on AP-1 DNA binding in epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **153**: 209-215, 1996.
- WALLEY, KR; LUKAS, NW; STANDIFORD, TJ; STRIETER, RM; KUNKEL, SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect. Immun.*, **64**: 4733-4738, 1996.
- WALSH, GM; MERMOD, JJ; HARTNELL, A; KAY, AB; WARDLAW, AJ. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is $\alpha_4\beta_1$ (very late antigen-4) dependent. *J. Immunol.*, **146**: 3419-3423., 1991.
- WALZOG, B; SCHAFFETTER-KOCHANNEK, K; GAEHTGENS, P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am. Physiol. Soc.*, **276**: 1125-1130, 1999.
- WANG, P; WU, P; SIEGEL, MI; EGAN, RW; BILLAH, MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, **153**: 811-816, 1994.
- WANG, P; WU, P; SIEGEL, MI; EGAN, RW; BILLAH, MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokines synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **270**: 9558-9563, 1995.
- WANIKIAT, P; WOODWARD, DF; ARMSTRONG, RA. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.*, **122**: 1135-1145, 1997.
- WARD, JK; BARNES, PJ; TADJKARIMI, S; YACOUB, MH; BELVISI, MG. Evidence for involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in human trachea. *J. Physiol.*, **483**: 525-536, 1995a.
- WARD, JK; BELVISI, MG; SPRINGALL, DR; ABELLI, L; TADJKARIMI, S; YACOUB, MH; POLAK, JM; BARNES, PJ. Human iNANC bronchodilatation and nitric oxide-immunoreactive nerves are reduced in

- distal airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **13**: 175-184, 1995b.
- WEINBERG, JB; GRANGER, DL; PISETSKY, DS; SELDIN, MF; MISUKONIS, MA; MASON, SN; PIPPEN, AM; RUIZ, P; WOOD, ER; GILKESON, GS. The role of nitric oxide in the pathogenesis on spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-*lpr/lpr* mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered N^G-monomethyl-L-arginine. *J. Exp. Med.*, **179**: 651-660, 1994.
- WHATLEY, RE; ZIMMERMAN, GA; PRESCOTT, SM; MCINTYRE, TM. Platelet-activating factor and PAF-like mimetic. In: Handbook of Lipid Research: lipid second messengers, BELL, RM (ed), New York: Plenum Press, pp: 239-276, 1996.
- WINDSOR, AC; MULLEN, PG; FOWLER, AA; SUGERMAN, H. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br. J. Surg.*, **80**: 10-17, 1993.
- WIRTH, K; HOCK, FJ; ALBUS, U; LINZ, W; ALPERMANN, HG; ANAGNOSTOPOULOS, H; HENKE, S; BREIPOHL, G; KÖNING, W; KNOLLE, J; SCHÖLKENS, BA. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 774-778, 1991.
- WIRTH, KJ; GEHRING, D; SCHOLKENS, BA. Effects of HOE 140 on bradykinin-induced bronchoconstriction in anesthetized guinea-pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **148**: 702-706, 1993.
- WRIGHT, C; CAMMISULI, S; BABOULENE, L; FOZZARD, J; ADCOCK, IM; BARNES, PJ. Cyclosporin A and glucocorticoids interact synergistically in T lymphocytes: implications for asthma therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**: 675-681, 1995.
- WOLKOW, PP. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm. Res.* **47**: 152-166, 1998.
- WORONICZ, JD; GAO, X; CAO, Z; ROTHE, M; GOEDDEL, DV. I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase α and NIK. *Science*, **278**: 866-869, 1997.
- XIE, Q; KASHIWARBARA, Y; NATHAN, C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 4705-4708, 1994.
- XING, Z; GAULDIE, J; GERARD, C; BAUMANN, H; JORDANA, M; LEI, X; ACHONG, MK. IL-6 is an anti-inflammatory cytokines required for

- controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.*, **101**: 311-320, 1998.
- YAMAGUCHI, Y; SATOH, Y; MIYAHARA, E; NOMA, K; FUNAKOSHI, M; TAKASHIMA, I; SAWAMURA, A; TOGE, T. Locoregional immunotherapy of malignant ascites by intraperitoneal administration of OK-432 plus IL-2 in gastric cancer patients. *Anticancer Res.*, **15**: 2201-2206, 1995.
- YOSHIMURA, T; MATSUSHIMA, K; OPPENHEIM, JJ; LEONARD, EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). *J. Immunol.*, **139**: 788-793, 1987.
- YOTSUMOTO, F; MANABE, T; OHSHIO, G. Bradykinin involvement in the aggravation of acute pancreatitis in rabbits. *Digestion*, **54**: 224-230, 1993.
- YOUSEFI, S; HEMMANN, S; WEBER, M; HOLZER, C; HARTUNG, K; BLASER, K; SIMON, HV. IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils: evidence for increased secretion in asthma. *J. Immunol.*, **154**: 5481-5490, 1995.
- ZASSHI, NY. Analysis of chemical mediators involved in acute inflammatory reaction with the rat pleurisy model. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **110**: 59-68, 1997.
- ZEITLIN, IJ; SMITH, AM. Mobilization of tissue kalikrein in inflammatory disease of the colon. *Gut*, **14**: 133-138, 1973.
- ZHANG, M; PENG, B; NIEHLS, J; BAUMGARTER, CR; BRUNEE, T; THALHOFER, S; DOROW, P; KUNKEL, G. Kinin generation acute pneumonia and chronic bronchitis. *Life Sciences*, **10**: 1747-1753, 1997.
- ZUANY-AMORIM, C; LEDUC, D; VARGAFTIG, BB; PRETOLANI, M. Characterisation and pharmacological modulation of antigen-induced peritonitis in actively sensitised mice. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 917-924, 1993.
- ZUANY-AMORIM, C; HAILE, S; LEDUC, S; DUMAREY, D; HUERRE, C; VARGAFTIG, BB; PRETOLANI, M. Interlukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J. Clin. Invest.*, **96**: 2644-2651, 1995.
- ZUANY-AMORIM, C; VARGAFTIG, BB; PRETOLANI, M. Modulation by IL-10 of antigen-induced allergic responses in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **92**: 141-146, 1997.