

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS  
LIGANTES DO RECEPTOR PERIFÉRICO DOS  
BENZODIAZEPÍNICOS: PK11195 E Ro5-4864.**

Dissertação 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 Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roseli Coimbra Farges

**SANDRA REGINA RACHADEL TORRES  
Florianópolis  
2001**

TORRES, Sandra. **Estudo da atividade antiinflamatória dos ligantes do receptor periférico dos benzodiazepínicos: PK11195 e Ro5-4864.** Florianópolis, 2001, 136pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roseli Coimbra Farges

Defesa: 15/02/2001

O tratamento *in vivo* em camundongos com ligantes do receptor periférico benzodiazepínico (PBR) exerceram efeito inibitório na resposta inflamatória em dois modelos de inflamação aguda. No primeiro modelo o efeito antiinflamatório em de pré-tratamento com os ligantes PBR, PK11195 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide e Ro5-4864 7-chloro-5-(4-Chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2-H-1,4-benzodiazepin-2, mostraram que a formação do edema em resposta a carragenina (300 µg/pata) foi inibida por PK11195 e Ro5-4864, em diferentes intervalos de tempo. O estudo do tempo resposta mostrou que a melhor resposta com ambos ligantes foi ótima em animais injetados no tempo de 24h, por esta razão este tempo de pré-tratamento foi escolhido para estudo da dose resposta. A formação do edema de pata em resposta a carragenina (300 µg/pata) foi reduzida por PK11195 e Ro5-4864 em diferentes doses (0,00001-10mg/kg, i.p.) produzindo uma inibição dose dependente na formação do edema de pata em camundongos induzida pela carragenina. PK11195 e Ro5-4864 (0.1 mg/kg, i.p.) quando administrado 24 h antes da indução do edema, inibiram de forma significativa o edema de pata de camundongos induzido por vários mediadores inflamatórios. No segundo modelo o pré-tratamento com os ligantes (0.1 mg/kg, i.p.), 24 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina, mostrou uma significativa inibição no recrutamento das células totais e diferenciais, principalmente a custos de neutrófilos, inibindo também a liberação de Interleucina-13 (IL-13) e Interleucina-6 (IL-6) no líquido pleural.

Palavras-chave: [receptor periférico benzodiazepínico], [edema de pata], [Pleurisia]

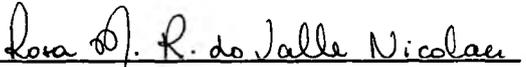
**“ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DOS  
LIGANTES DO RECEPTOR PERIFÉRICO DOS  
BENZODIAZEPÍNICOS: PK 11195 E Ro - 4864 ”**

**POR**

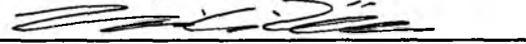
**SANDRA REGINA RACHADEL TORRES**

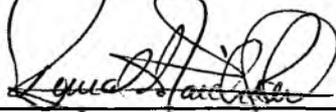
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
**Rosa Maria R. do Valle Nicolau(Orientadora)**  
**(FMC/UFSC - Membro Titular)**

  
**Maria Salete de A. Castro**  
**(UFMG -Membro Titular)**

  
**Tânia da Silva Fröde**  
**(CCS-UFSC - Membro Titular)**

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

**Florianópolis, 15 de fevereiro de 2001.**

*Este trabalho é dedicado a meu filho Israel e a meu marido Romar, que com sacrifício, amor, compreensão e incentivo tornaram possível a realização de mais um sonho.*

*Aos meus pais Ari Rachadel e Zulma da Silva Rachadel, pela minha formação e pelo amor a mim dedicado durante toda minha vida. A minha irmã Helaine pelo carinho que nos une. Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos pelo carinho e solidariedade.*

*À Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, pela oportunidade de crescer na minha formação científica, e principalmente pela grande amizade que nasceu ao longo destes anos.*

*“As grandes distâncias são vencidas por pequenos passos, desde que esses não se afastem do rumo e nunca deixem de serem dados”.*

*HERMÓGENES*

## AGRADECIMENTOS

*Gostaria de usar este espaço como forma de retribuir o carinho para com aqueles que estiveram me acompanhando na realização deste trabalho.*

*Agradecimento especial a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roseli Coimbra Farges, pelo incentivo, cooperação e valiosa co-orientação.*

*Aos Professores do Departamento de Farmacologia, pela colaboração e conhecimentos transmitidos.*

*Aos amigos de turma: Janice, Marco, Juliano, Márcia, Eunice, Fábio, George, Luciana, Maria Claudia e Rodrigo, pelo bom relacionamento.*

*Aos amigos do Laboratório: Melani, Elke, Rose, Karina, Silvia, Denise, Paulo e Ricardo, pela união e pelo excelente clima de trabalho.*

*A Geisson Marcos Nardi e Maike Cristine Schuldt, pela grande amizade, além das valiosas sugestões e disposição em ajudar.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tânia Silvia Fröde, por sua amizade, grande apoio e troca de informações.*

*A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Pedro, Elza, Sandra, Goretti e Diana, pelo grande auxílio.*

*A todos os colegas do Instituto de Análise Laboratoriais (IAL) da Diretoria de Polícia Técnico- Científica (DPTC), que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.*

*À Dulce Maria Halfpap, pela grande amizade, colaboração e companheirismo.*

*A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.*

***A Deus, que nunca me abandonou , muito obrigada.***

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTAS DE TABELAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1. Receptor Periférico dos Benzodiazepínicos.....	<b>01</b>
1.2. Processo inflamatório nos modelos da pleurisia e edema de pata induzidos pela carragenina.....	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1. Animais.....	<b>14</b>
3.2. Protocolos experimentais.....	<b>14</b>
3.2.1. Edema de pata em camundongos.....	<b>14</b>
3.2.1.1. Avaliação do efeito do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos.....	<b>15</b>
3.2.1.2. Avaliação do efeito do PK11195 sobre a atividade do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos.....	<b>16</b>
3.2.1.3. Avaliação do efeito do PK11195 e do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos adrenalectomizados.....	<b>16</b>
3.2.1.4. Avaliação do efeito do PK11195 e do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido por diferentes mediadores, em camundongos.....	<b>17</b>

3.2.1.5. Avaliação da capacidade do PK11195 e do Ro5-4864 em inibir a ação edematogênica do óxido nítrico, no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.....	18
3.2.1.6. Avaliação do efeito da interleucina –13 (IL-13) na atividade antiedematogênica do PK11195 e do Ro5-4864 no edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos.....	18
3.2.2. Avaliação do efeito do PK11195 e do Ro5-4864 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (4 h) .....	19
3.2.2.1. Indução da pleurisia.....	19
3.2.2.2. Quantificação do exsudato.....	19
3.2.2.3. Contagem de leucócitos.....	20
3.2.2.4. Efeito dos ligantes PBR nos níveis de IL-6 e IL-13 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	21
3.3. Drogas e reagentes.....	22
3.4. Análise estatística.....	23
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos.....	24
4.2. Efeito do PK11195 sobre a atividade do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.....	34
4.3. Efeito do PK11195 e do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos adrenalectomizados.....	37
4.4. Efeito do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido por diferentes mediadores, camundongos.....	40

4.5. Avaliação da modulação pelo PK11195 e Ro5-4864 sobre a ação edematogênica do óxido nítrico no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos.....	53
4.6. Participação da interleucina-13 (IL-13) na atividade antiedematogênica do PK11195 e Ro5-4864 no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.....	58
4.7. Efeito do PK11195 e do Ro5-4864 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (4 h) em camundongos (4 h).....	70
4.8. Efeito do PK11195 e do Ro5-4864 nos níveis de IL-6 e IL-13 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos (4 h).....	80
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>6. PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>7. RESUMO.....</b>	<b>100</b>
<b>8. ABSTRACT.....</b>	<b>103</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE ABREVIações

ADL	Adrenalectomizados
BK	Bradicinina
CBRs	Receptor Central dos Benzodiazepínicos
CD4+	Linfócitos T auxiliares
Cg	Carragenina
COX	Ciclooxigenase
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos
5-HT	Serotonina
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratorácica
ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
PAF-acéter	Fator ativação plaquetária
PBR	Receptor Periférico dos Benzodiazepínicos
PBS	Salina fosfato tamponada
PeCaM	Molécula de adesão relacionada com as plaquetas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PK11195	1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide
pmol	Picomol
Ro5-4864	7-chloro-5-(4-Chlorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2-H-1,4-benzodiazepin-2
FO	Falso-operados
SP	Substância P
TNF	Fator de necrose tumoral
v.o.	Via oral
VLA-4	Molécula de adesão (very late antigen)
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µmol	Micromol

GABA	Ácido Gama- Aminobutírico
MBR	Receptor Benzodiazepínico Mitocondrial
MDR	Receptor Mitocondrial do DBI
DBI	Inibidor da ligação do diazepam
ODN	Octadecanoneuropeptídeo
ENP	Eicosaneuropeptídeo
TTN	Tricontatetraneuropeptídeo
VDAC	Canal ânion voltagem dependente
ADC	Transportador de adenina
GAD	Desordem da ansiedade generalizada
CGD	Doença granulomatosa crônica
FO	Falso Operado

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura I</b> (Introdução) – Estrutura química dos ligantes PBR (PK11195 e Ro5-4864).....	<b>2</b>
<b>Figura II</b> (Introdução) – Modelo proposto da topologia do PBR.....	<b>4</b>
<b>Figura 1</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 em diferentes tempos de tratamento no modelo do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>26</b>
<b>Figura 2</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 em diferentes doses de tratamento no modelo do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>28</b>
<b>Figura 3</b> - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 em diferentes tempos de tratamento no modelo do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>30</b>
<b>Figura 4</b> - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 em diferentes doses de tratamento no modelo do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>32</b>
<b>Figura 5</b> - Efeito do PK11195 1 hora antes, sobre a atividade antiedematogênica do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.....	<b>35</b>
<b>Figura 6</b> - Efeito do PK11195 24 hora antes, sobre a atividade antiedematogênica do Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.....	<b>36</b>

<b>Figura 7</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos adrenalectomizados.....	<b>38</b>
<b>Figura 8</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes da injeção intraplantar de histamina.....	<b>42</b>
<b>Figura 9</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes da injeção intraplantar de bradicinina.....	<b>44</b>
<b>Figura 10</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes da injeção intraplantar de substância P.....	<b>46</b>
<b>Figura 11</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes da injeção intraplantar de prostaglandina.....	<b>48</b>
<b>Figura 12</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes da injeção intraplantar de PAF-acéter (PAF).....	<b>50</b>
<b>Figura 13</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes da injeção intraplantar de serotonina.....	<b>52</b>
<b>Figura 14</b> - Efeito da co-injeção intraplantar de L-arginina (L-arg), L-NAME e L-arg + L-NAME sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos.....	<b>54</b>
<b>Figura 15</b> - Avaliação da modulação pelo PK11195 e Ro5-4864 sobre a ação edematogênica do óxido nítrico no modelo do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>56</b>
<b>Figura 16</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (1 pmol/pata), 5 min antes do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>60</b>

- Figura 17** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata), 5 min antes do edema de pata induzido pela carragenina.....**62**
- Figura 18** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (100 pmol/pata), 5 min antes do edema de pata induzido pela carragenina.....**64**
- Figura 19** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B), administrados 24 h antes da injeção intraplantar simultânea de IL-13 (10 pmol/pata) e carragenina.....**66**
- Figura 20** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata), 10 min antes da injeção de carragenina.....**68**
- Figura 21** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 administrados 1 h antes sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina 1% em camundongos.....**72**
- Figura 22** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 administrados 12 h antes sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina 1% em camundongos.....**74**
- Figura 23** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina 1% em camundongos.....**76**
- Figura 24** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 administrados 24 h antes sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida por carragenina 1% em camundongos.....**78**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195, quando administrado em diferentes tempos antes da injeção intraplantar de carragenina em camundongos.....	<b>27</b>
<b>Tabela 2</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195, quando administrado em diferentes doses, 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina em camundongos.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3</b> - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 quando administrado em diferentes tempos, antes da injeção intraplantar de carragenina em camundongos.....	<b>31</b>
<b>Tabela 4</b> - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864, quando administrado em diferentes doses, 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina em camundongos.....	<b>33</b>
<b>Tabela 5</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos adrenalectomizados.....	<b>39</b>
<b>Tabela 6</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrado 24 h antes da injeção intraplantar de histamina.....	<b>43</b>
<b>Tabela 7</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrado 24 h antes da injeção intraplantar de bradicinina.....	<b>45</b>
<b>Tabela 8</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrado 24 h antes da injeção intraplantar de substância P.....	<b>47</b>

<b>Tabela 9</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrado 24h antes da injeção intraplantar de prostaglandina E <sub>2</sub> .....	<b>49</b>
<b>Tabela 10</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 administrado 24h antes da injeção intraplantar de PAF.....	<b>51</b>
<b>Tabela 11</b> - Efeito da co-injeção intraplantar de L-arginina (L-arg), L-NAME e L-arg + L-NAME sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.....	<b>55</b>
<b>Tabela 12</b> - Avaliação da modulação pelo PK11195 e Ro5-4864 sobre a ação edematogênica do oxido nítrico no modelo do edema de pata induzido pela carragenina.....	<b>57</b>
<b>Tabela 13</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (1 pmol/pata) administrada 5 min antes da carragenina.....	<b>61</b>
<b>Tabela 14</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata) administrado 5 min antes da carragenina.....	<b>63</b>
<b>Tabela 15</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (100 pmol/pata) 5 min antes da carragenina.....	<b>65</b>
<b>Tabela 16</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B) administrados 24 h antes da injeção intraplantar simultânea de IL-13 (10 pmol/pata) e carragenina.....	<b>67</b>
<b>Tabela 17</b> - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864, administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata) administrada 10 min antes da carragenina.....	<b>69</b>
<b>Tabela 18</b> - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).....	<b>73</b>

<b>Tabela 19</b> - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 12 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).....	<b>75</b>
<b>Tabela 20</b> - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).....	<b>77</b>
<b>Tabela 21</b> - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,01 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).....	<b>79</b>
<b>Tabela 22</b> - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 nos níveis de IL-6 e IL-13 no lavado alveolar no modelo da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongos, na primeira fase do processo inflamatório (4 h).....	<b>81</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. RECEPTOR PERIFÉRICO DOS BENZODIAZEPÍNICOS

Os benzodiazepínicos são medicamentos muito utilizados devido às suas ações ansiolíticas, anticonvulsivantes, sedativas e mio-relaxantes. Durante vários anos, estabeleceu-se que os principais efeitos farmacológicos destes medicamentos eram mediados exclusivamente por receptores localizados no sistema nervoso central (SNC), associados ao complexo GABA<sub>A</sub>-canal de cloro, conhecidos como receptores centrais dos benzodiazepínicos ou CBRs (Costa *et al.*, 1975). De fato, vários dados comportamentais, farmacológicos e eletrofisiológicos demonstram que os benzodiazepínicos, através de sua ligação ao CBR, são capazes de modular uma grande parte dos efeitos induzidos pelo principal neurotransmissor inibidor do SNC, o ácido gama-aminobutírico (GABA), pelo fato de aumentarem a afinidade desse neurotransmissor pelo CBR (Bowery *et al.*, 1984). Estudos feitos com a finalidade de demonstrar a especificidade dos receptores benzodiazepínicos no SNC, porém, inesperadamente revelaram a presença de sítios de fixação do diazepam, o principal benzodiazepínico utilizado na clínica, em tecidos periféricos (Braestrup e Squires, 1977). Posteriormente, observou-se que estes sítios eram farmacologicamente diferentes do complexo GABA<sub>A</sub>-canal de cloro (Regan *et al.*, 1980; Marangos *et al.*, 1982), sendo denominados receptores periféricos dos benzodiazepínicos (PBRs), pelo fato de terem sido descritos inicialmente em tecidos periféricos; porém estudos posteriores demonstraram sua existência também no SNC (Schoemaker *et al.*, 1981). Outras denominações foram sugeridas para este receptor, tais como: receptor benzodiazepínico mitocondrial (MBR), denominado assim devido a sua localização predominantemente mitocondrial; e receptor mitocondrial do DBI (MDR), sendo o DBI o peptídeo que compete com o diazepam em seus sítios de ligação e que tem sido um dos candidatos a ligantes endógenos do PBR (Krueger *et al.*, 1992; McEnery *et al.*, 1992; Papadopoulos *et al.*, 1992).

De todos os compostos sintéticos desenvolvidos para estudos do PBR, o benzodiazepínico Ro5-4864, que difere da estrutura do diazepam somente pela adição de um cloro em um de seus anéis aromáticos, e o PK11195 uma isoquinolina

(Figura I). Baseando-se em estudos termodinâmicos de interação ligante-receptor, sugeriu-se que o Ro5-4864 poderia ser classificado como um agonista e o PK11195 como um antagonista ou agonista parcial do PBR (Le Fur *et al.*, 1983) do PBR. Porém, o significado funcional desta classificação é atualmente questionável, pelo fato de que ambos têm efeitos similares em diferentes modelos experimentais (Mukhin *et al.*, 1989; Papadopoulos *et al.*, 1990). O Ro5-4864, não possui atividade ansiolítica e se liga com fraca afinidade ao CBR (Braestrup e Squires, 1977), ligando-se porém com alta afinidade ao PBR, enquanto o PK11195, liga-se especificamente ao PBR (Le Fur *et al.*, 1983). O diazepam apresenta o mesmo nível de afinidade pelo PBR e CBR; mas o benzodiazepínico clonazepam, que é usado clinicamente como anticonvulsivante, possui alta afinidade em sítio localizados em cérebro de rato, e liga-se com baixa afinidade em sítios de diferentes tecidos periféricos (Braestrup e Squire, 1977). O flunitrazepam, ligante de fotoafinidade que foi utilizado na identificação de diferentes subunidades do CBR, reconhece tanto o CBR quanto o PBR, sendo que a ordem de grandeza desta afinidade é 100 vezes maior para o receptor central. A quinolina PK14105 liga-se especificamente ao PBR (Dubroeuq *et al.*, 1986; Doble *et al.*, 1987).

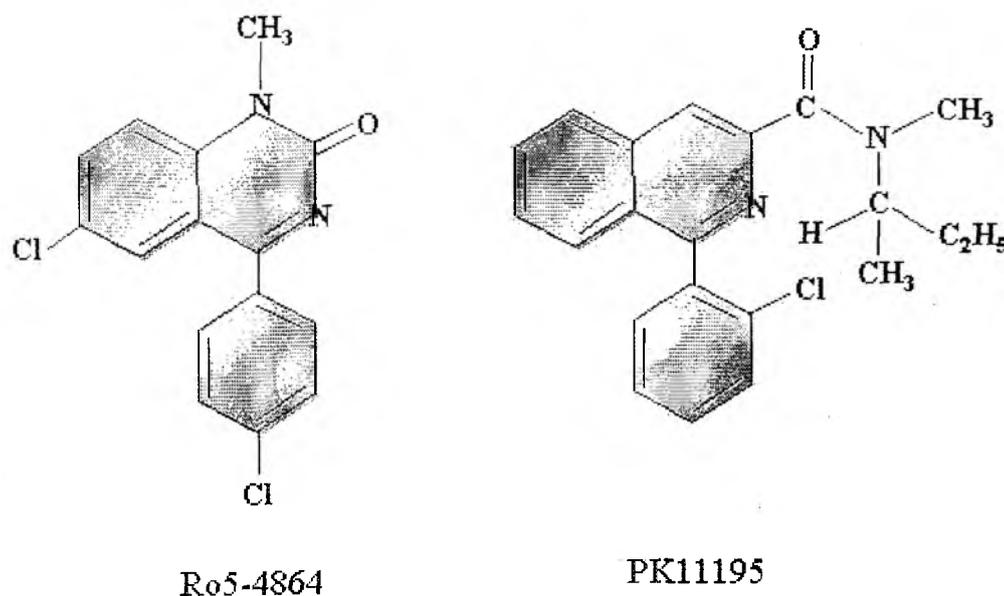


Figura I

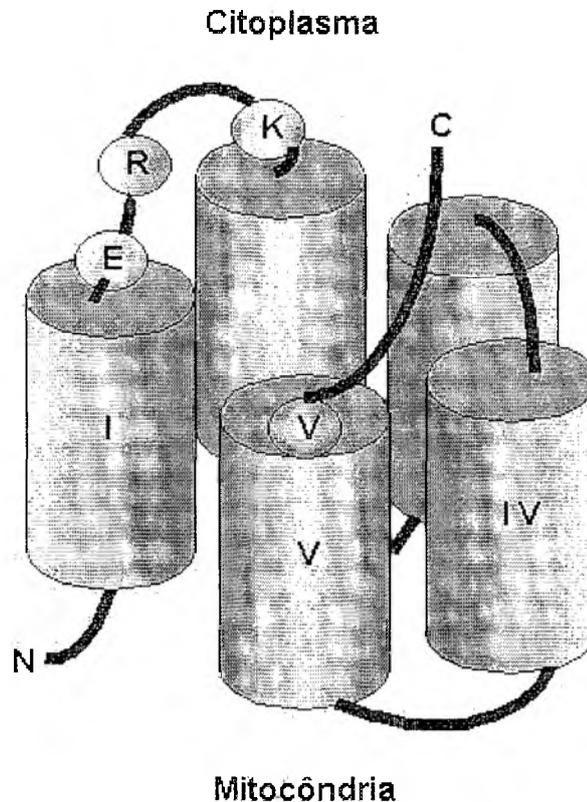
Seguindo a ordem cronológica dos ligantes sintéticos, as isoquinolinas foram desenvolvidas para o estudo do receptor PBR, todavia diferente das quinolinas, as imidazopiridinas ligam-se tanto ao PBR quanto ao CBR (Benavides *et al.*, 1983),

sendo que nesta série de compostos pertencem o alpidem e o zolpidem, com afinidade ao receptor PBR variando entre nM e mM, respectivamente. Mais recentemente, baseados na estrutura química das imidazopiridinas, uma nova série de compostos foram desenvolvidos: as 2 aril-3 indoleacetamidas (Romeo *et al.*, 1992). O protótipo desta série é o FGIN-1-27, que tem afinidades por outros receptores como por exemplo, GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, glicina, glutamato, dopamina, serotonina, opiáceos e adrenérgicos canabinóides (Romeo *et al.*, 1992).

Existem também moléculas endógenas que apresentam afinidade ao PBR, sendo por esta razão candidatas a ligantes endógenos deste receptor. Dois grupos de famílias de moléculas foram assim identificados: as endozepinas e as porfirinas. O nome endozepina está relacionado a uma família de peptídeos endógenos que apresentam uma afinidade aos receptores benzodiazepínicos e que derivam de um polipeptídeo de 15 kDa denominado inibidor da ligação do diazepam (DBI), o qual possui uma afinidade da ordem de micromolar para o PBR e CBR (Guidotti *et al.*, 1978; Guidotti *et al.*, 1983). O DBI pode gerar por clivagem proteolítica vários fragmentos biologicamente ativos incluindo o ODN (octadecanoneuropeptídeo) também chamado de DBI 33-50, o ENP (eicosaneuropeptídeo) também chamado de DBI 26-50, e o TTN (tricontatetraneuropeptídeo) ou DBI 17-50 (Slobodyansky *et al.*, 1989, Bovolín *et al.*, 1990 ). O TTN possui uma maior afinidade pelo PBR enquanto que o ODN tem uma melhor afinidade pelo CBR (Awad *et al.*, 1987; Evans-Shields *et al.*, 1991; Parola *et al.*, 1991; Papadopoulos *et al.*, 1992). As porfirinas endógenas como protoporfirina IX, mesoporfirina IX, deuteroporfirina IX, e hemina possuem uma afinidade da ordem de nanomolar pelo PBR enquanto que se ligam ao CBR com uma afinidade 1000 vezes menor (Verma e Snyder, 1988).

Estudos de biologia molecular utilizando-se sondas de DNA (cDNAs) demonstraram que o PBR de alguns animais como: de rato (Sprengel *et al.*, 1989), camundongo (Garnier *et al.*, 1994), boi (Parola *et al.*, 1991) e homem (Riond *et al.*, 1991a) foram clonados e não apresentam nenhuma homologia na seqüência de aminoácidos com o CBR (Parola *et al.*, 1993). Os 4 cDNAs do PBR codificam para uma proteína de 18 kDa, como já haviam sugerido resultados obtidos em gel de eletroforese após fotomarcagens com [<sup>3</sup>H] PK1405, que é uma sonda de fotoafinidade derivada do PK11195. As seqüências primárias deduzidas dos nucleotídeos do cDNA de aminoácidos dos PBRs obtidas nas quatro espécies mostraram uma conservação de aproximadamente 80%. Estudos ainda revelam que

apesar do pequeno tamanho esta proteína apresenta 5 segmentos com potenciais localizações transmembranárias, com uma seqüência carboxi-terminal exposta do lado citoplasmático, sendo o modelo estrutural proposto do PBR na membrana mitocondrial apresentado na Figura II (Sprengel *et al.*, 1989; Bernassau *et al.*, 1993).



**Figura II** - Modelo estrutural simplificado proposto do PBR. As supostas 5 hélices transmembranárias são organizadas numa estrutura em forma de póro. A seqüência amino-terminal é localizada na região intramembranária da mitocôndria, e a seqüência carboxi-terminal é exposta do lado citoplasmático.

A purificação do PBR mitocondrial, resultou em um complexo formado pela proteína de 18 kDa, assim como duas outras proteínas de 32kDa e 30kDa. A proteína de 32 kDa foi identificada como sendo o canal de ânion voltagem dependente (VDAC), e aquela de 30kDa como transportador de adenina (ADC), e estão localizadas na membrana externa e interna da mitocôndria, respectivamente. (McEnery *et al.*, 1992). Estes dados revelam que a organização estrutural do PBR é bem diferente daquela observada no CBR, o qual é supostamente um receptor pentamérico formado de um grande número de subunidades. Estas subunidades

são denominadas de acordo com suas estruturas primárias em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$  ou  $\pi$ , as quais são bastante heterogêneas em suas composições (Sieghart, 1995; Mohier *et al.*, 1996; Macdonald *et al.*, 1996). A maioria dos receptores GABA<sub>A</sub> é composta de variantes das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  junto com uma subunidade  $\gamma_2$  circundando um canal de cloro central, sendo que  $\alpha$  e  $\beta$  são essenciais para a fixação do GABA, enquanto  $\alpha$  e  $\gamma$  parecem ser essenciais para a fixação dos benzodiazepínicos (Sigel *et al.*, 1992; Amin e Weiss, 1993; Smith e Olsen, 1994).

Apesar do PK11195 e Ro5-4864 serem capazes de deslocarem um ao outro em estudos de competição, existem evidências sugerindo que eles se liguem em regiões diferentes do PBR. Por exemplo, as ligações dos benzodiazepínicos e das isoquinolinas no PBR de ratos podem ser perturbadas de maneira distinta por vários tratamentos enzimáticos ou químicos (Le Fur *et al.*, 1983a; Benavides *et al.*, 1985; Sprengel *et al.*, 1989). Estudos iniciais sugeriram que os sítios de ligação dos benzodiazepínicos estão situados no VDAC e ADC, enquanto as isoquinolinas se ligariam na proteína de 18 kDa, pelo fato de ter sido observado que os benzodiazepínicos [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam e [<sup>3</sup>H]-AHN-086 marcam somente as proteínas de 30 e 32 kDa (Snyder *et al.*, 1987; Lueddens *et al.*, 1989) enquanto que a isoquinolina [<sup>3</sup>H] PK1405 foi capaz de marcar somente a proteína de 18 kDa (Doble *et al.*, 1987a).

Porém, estudos posteriores foram utilizados para clarificar o papel de cada uma destas subunidades na ligação do PK11195 e Ro5-4864, onde PBR bovino e humano foram expressos em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo desprovido de PBR, mas possuindo o VDAC e ADC em suas mitocôndrias. Estes estudos demonstraram que os PBRs humano e bovino eram capazes de ligarem [<sup>3</sup>H] PK11195 enquanto só o PBR humano liga-se ao [<sup>3</sup>H]Ro5-4864. Utilizando a estratégia de substituir sistematicamente segmentos do PBR humano por segmentos de PBR bovino equivalentes, definiu-se que a região de ligação do Ro5-4864 situa-se na parte C-terminal do PBR (Farges *et al.*, 1993). Uma série de deleções e mutações pontuais na região C-terminal do PBR humano confirmaram que a valina (VAL), na posição 154 da proteína 18 kDa, é um aminoácido essencial para a ligação do Ro5-4864 ao PBR. Para confirmar esta hipótese, foi feita substituição desse aminoácido VAL-154 no receptor bovino e verificou-se que a capacidade de ligação para o Ro5-4864 foi estabelecida (Farges *et al.*, 1994). O

conjunto de dados obtidos com estas deleções e mutações pontuais sugerem também que a primeira e quinta regiões transmembranárias possivelmente situam-se próximas uma da outra no citoplasma e somam-se com a proposta do modelo tridimensional do PBR, onde as cinco regiões transmembranárias estão organizadas numa estrutura, formando um poro como aquela descrita por Bernassau *et al.*, (1993) (Fig 4).

Estudos de fotomarcagem com [<sup>3</sup>H] PK14105, seguidos de digestão enzimática sugeriram que as isoquinolinas se fixam na parte N-terminal da proteína 18 kDa (Riond *et al.*, 1991). Em uma série de estudos utilizando leveduras deletadas no gene VDAC e/ou ADC, e transfectadas com a proteína de 18 kDa, confirmou-se que a capacidade de ligação do PK11195 e Ro5-4864 dependem exclusivamente da proteína de 18 Kda, além de demonstrar-se, contrariamente ao que havia sido observado por outras equipes, que o flunitrazepam é capaz de fotomarcado tanto o VDAC, quanto à proteína de 18 kDa, (Liauzun, 1997). Estes dados demonstram que somente a proteína de 18 kDa é necessária para a fixação do Ro5-4864 e PK11195, porém não exclui a possibilidade de que a associação PBR, VDAC e ADC não seja necessária para uma resposta fisiológica.

As três proteínas, PBR, VDAC e ADC apresentam uma localização mitocondrial. O PBR está localizado principalmente na membrana externa da mitocôndria (Anholt *et al.*, 1986), porém alguns estudos têm sugerido uma localização não mitocondrial desta proteína (Olson *et al.*, 1988), essas três proteínas juntas devam formar um póro nos sítios de contato mitocondrial (McEnery *et al.*, 1992). Esta localização é diferente da do CBR, o qual é concentrado em membranas pós-sinápticas (Baer *et al.*, 1999). Enquanto o CBR foi encontrado exclusivamente no sistema nervoso central, a distribuição do PBR foi praticamente em todos os tecidos examinados, sendo o nível de expressão bastante variado. Em vários tecidos glandulares e secretores como glândulas adrenais e salivares, testículos, ovário, útero e placenta o PBR é particularmente abundante (Fares *et al.*, 1987; Verma *et al.*, 1989). Altas densidades deste receptor têm sido encontradas também no coração e nas plaquetas (Taniguchi *et al.*, 1982; Benavides *et al.*, 1984), no fígado, no pulmão (Anholt *et al.*, 1986; Parola *et al.*, 1993) em tecidos que envolvem transporte de eletrólitos como segmentos dos néfrons dos rins (Benavides *et al.*, 1983), e em outros tecidos como músculo esquelético e trato gastrointestinal

(Verma *et al.*, 1989 ). No SNC, os PBR são encontrados no plexo coróide e na glia (Marangos *et al.*, 1982; Gehlert *et al.*, 1983; Schoemaker *et al.*, 1983; Papadopoulos *et al.*, 1992). O PBR também foi identificado em todas as células sanguíneas examinadas, expressas na seguinte ordem com relação ao número de receptores: monócitos = neutrófilos; linfócitos B e linfócitos T (Natural Killer, CD4 e CD8 positivo) > plaquetas > eritrócitos (Canat *et al.*, 1993a).

Sabe-se que muitas substâncias como benzodiazepínicos, barbitúricos, esteróides neuroativos, álcool e anestésicos produzem alguns de seus efeitos farmacológicos via receptor GABA<sub>A</sub>. A função fisiológica do CBR já está bem estabelecida com relação as principais ações farmacológicas dos benzodiazepínicos, os quais ligam-se ao CBR potencializando a ação do GABA, aumentando desta forma a atividade inibidora desse neurotransmissor e produzindo assim efeitos ansiolíticos, sedativos e anticonvulsivantes (Regan *et al.*, 1981; Mamalaki *et al.*, 1987). A função fisiológica do PBR todavia foi originalmente considerada como insignificante com relação às principais ações farmacológicas dos benzodiazepínicos, mas quando estudos sugeriram que este receptor teria um papel na regulação endócrina da biosíntese de esteróides, houve interesse em conhecer melhor a sua função. Evidências iniciais de que o PBR estaria relacionado com a esteroidogênese vem do fato que células estereidogênicas apresentam as mais altas densidades de sítio de fixação aos ligantes do PBR, e de que estes receptores estejam localizados principalmente na membrana externa da mitocôndria (Anholt *et al.*, 1985; De Souza *et al.*, 1985; Anholt *et al.*, 1986). Anholt *et al.*, (1985) foi o primeiro a sugerir que o PBR teria um papel na regulação endócrina da adrenal e testículos, após demonstrar que a hipofisectomia induz uma diminuição significativa da densidade de PBR tanto na adrenal, como nos testículos. Algum tempo depois foi demonstrada a capacidade dos ligantes do PBR em estimular a esteroidogênese não só na adrenal (Besman *et al.*, 1989; Mukhin *et al.*, 1989); placenta (Barnea *et al.*, 1989); testículo (Papadopoulos *et al.*, 1990) e ovário (Amsterdam e Suh, 1991), mas também em células da glia, células de Schwam e em tecidos como o fígado (Papadopoulos *et al.*, 1992, Tsankova *et al.*, 1995, Lacor *et al.*, 1999). Krueger e Papadopoulos (1990) sugerem que os ligantes do PBR ativam a produção esteroideal ligando-se ao PBR e facilitando assim a translocação do colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria. Krueger e colaboradores (1995) completam esta hipótese sugerindo que o PBR, após ativação de um ligante

específico, levaria o colesterol para dentro da mitocôndria facilitando o contato do colesterol com o citocromo P450<sub>scc</sub>, na membrana interna da mitocôndria, esta enzima catalisa a conversão de colesterol em pregnenolona. O benzodiazepínico, DBI e a protoporfirina também demonstram a habilidade de estimular a biosíntese de esteróides em culturas celulares utilizando mitocôndrias de glândula adrenal e fígado (Besman *et al.*, 1989; Yanagibashi, 1989 ; Tsankova *et al.*, 1995).

O PBR parece estar também envolvido na diferenciação e proliferação celulares. De fato tem sido demonstrado um aumento da densidade de PBRs em diferentes tecidos neoplásicos, tal como em carcinoma e adenocarcinoma do ovário (Katz, 1990b; Katz, 1990c), e tumores do cérebro (Ferrarese *et al.*, 1989; Black *et al.*, 1990; Ikezaki e Black, 1990). Um maior aumento de PBRs foi detectado em células tumorais de glioma, sendo que PK11195 e PK14105 tem sido por esta razão utilizados como marcadores em tomografia para diagnosticar certos tumores cerebrais (Starosta-Rubinstein *et al.*, 1987; Black *et al.*, 1990).

A biópsia de tumores de seio possuindo metástases altamente invasivas também demonstrou um aumento significativo de PBRs (Hardwick *et al.*, 1999). A correlação entre a afinidade do ligante pelo PBR e a sua atividade antiproliferativa varia com o tipo celular observado. Por exemplo, esta correlação é forte quando observamos a diminuição da proliferação de células tumorais de timos de camundongo (Wang *et al.*, 1984), e a inibição da proliferação de linfócitos do baço de camundongos pelo Ro5-4864 e Diazepam (Pawlikowski *et al.*, 1988). A correlação é baixa quando observamos que PK11195 e Ro5-4864 inibem a proliferação de células de carcinoma mamário somente quando utilizados em altas concentrações ( $10^{-5}$  a  $10^{-4}$ M) (Ikezaki e Black, 1990).

Alguns estudos sugerem a participação do PBR na fosforilação oxidativa. Hirsch *et al.*, (1988) e Moreno-sanchez *et al.*, (1991) descreveram a capacidade dos ligantes do PBR em produzir a inibição do controle respiratório em mitocôndrias de rim, propondo por esta razão um papel do PBR na modulação da respiração mitocondrial. Zisterer *et al.*, (1992), porém sugerem que a ação dos ligantes do PBR na inibição da respiração não é via PBR, pelo fato de que esta ação é observada somente em concentrações muito altas de ligantes.

A participação do PBR na adaptação fisiológica ao estresse também tem sido sugerida. Drugan *et al* (1986) foi o primeiro a mostrar o envolvimento do PBR na resposta fisiológica ao estresse, observando que ratos submetidos a um estresse

agudo apresentavam um aumento da densidade de PBRs renal. Confirmando estes dados, estudos posteriores demonstraram que diferentes tipos de estresses agudos em animais, tais como: exposição rápida ao choque elétrico de alta intensidade, nado forçado, ruídos, também aumentaram significativamente a densidade de PBR não só periféricamente, como nos ventrículos cardíacos, rim, glândula adrenal, plaquetas e linfócitos como também em diferentes locais do SNC como córtex cerebral, bulbo olfatório e hipocampo (Basile *et al.*, 1987; Novas *et al.*, 1987; Rago *et al.*, 1989 a,b; Ferraresse *et al.*, 1991). Alguns destes estresses induziram também a um aumento de moléculas relacionadas ao DBI na adrenal e no hipocampo (Ferraresse, 1991). Em humanos também se observou um aumento significativo de PBRs em plaquetas de candidatos a uma vaga de residente em psiquiatria, obtidas alguns minutos antes de se submeterem à prova de seleção (Karp *et al.*, 1989).

Contrariamente, a exposição de animais ao estresse crônico usando choque elétrico, nado forçado, privação de alimentos por longo período, resultou em uma diminuição significativa de PBRs no rim, no coração, na adrenal, na hipófise e no córtex cerebral (Weizmann *et al.*, 1990; Burgin *et al.*, 1996). Em humanos constatou-se uma redução da densidade de PBRs plaquetários e linfocitários após um estresse repetitivo, assim como em pacientes sofrendo de ansiedade (Weizman *et al.*, 1987b; Dar *et al.*, 1991).

Outras condições patológicas envolvendo o PBR tais como a desordem da ansiedade generalizada (GAD), tem sido descrita. A GAD é caracterizada por ansiedade e preocupação excessivas (American Psychiatric Association, 1994). Foi observado que pacientes com GAD apresentam uma diminuição de 24% de PBR nas plaquetas, sendo que o tratamento com diazepam aumentou (69%) a densidade do receptor (Weizman *et al.*, 1987b). Resultados similares foram obtidos utilizando linfócitos (Ferraresse *et al.*, 1990; Rocca *et al.*, 1991). A estes resultados somam-se os encontrados na desordem do pânico (Marrazziti *et al.*, 1994), e fobia social generalizada (Johnson *et al.*, 1995).

Uma mudança na densidade de PBRs também foi observada em desordens neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e de Alzheimer, onde observou-se uma diminuição e um aumento de PBRs, respectivamente (Owen *et al.*, 1983; Bonuccelli *et al.*, 1991; Diori *et al.*, 1991).

Muitas evidências sugerem que o PBR deva ter um envolvimento importante com a regulação das funções imunes e do processo inflamatório. Por exemplo, o

PBR está presente no timo, baço, nódulos linfáticos (Benavides *et al.*, 1989) e em diferentes células teciduais monócitos (Zavala *et al.*, 1984), neutrófilos (Zavala *et al.*, 1991), linfócitos (Wang *et al.*, 1980) incluindo células B, natural killer, células CD4 e CD8 positivas (Canat *et al.*, 1993a) e monócitos (Moingeon *et al.*, 1983). PK11195, Ro5-4864 e diazepam, mas não o clonazepam que é um ligante seletivo CBR, exercem atividade imunomodulatória, como a quimiotaxia em monócitos humanos (Ruff *et al.*, 1985), inibem a proliferação de células mononucleares sangüíneas e do timo (Wang *et al.*, 1984; Bessler *et al.*, 1992), além de induzirem, *in vivo*, a estimulação da resposta imune humoral (Zavala *et al.*, 1985). Ligantes do PBR, mas não ligantes do CBR, inibem fortemente a formação de ânions superóxidos, IL-1, TNF e IL-6 pelos macrófagos, e de IL-2 e interleucinas semelhantes a IL-3 por monócitos e macrófagos (Zavala *et al.*, 1987, 1990; Bessler *et al.*, 1992). Além disto, foi demonstrada uma forte diminuição de PBR em neutrófilos de pacientes com granulomatose crônica (CGD), doença caracterizada pela ausência de produção de ânions superóxidos pelos neutrófilos e macrófagos, tendo como consequência uma grande sensibilidade do paciente a infecções por fungos e bactérias (Zavala *et al.*, 1990b). Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é utilizado clinicamente para restaurar parcialmente a atividade fagocitária destes pacientes. A incubação de macrófagos de pacientes CGD com IFN- $\gamma$ , *in vitro*, restaura a expressão de PBRs nestas células (Zavala *et al.*, 1990c).

Os dados descritos acima demonstram que os ligantes do PBR tem a capacidade de modular funções fagocitárias envolvidas tanto em mecanismos de defesa, como também na resposta inflamatória, sugerindo que estas moléculas poderiam ser drogas antiinflamatórias em potencial. Com o objetivo de verificarmos esta hipótese, desenvolvemos um trabalho onde analisamos a ação antiinflamatória dos PK11195 e Ro5-4864 em dois modelos de inflamação aguda em camundongos: o edema de pata, induzido pela carragenina e por diferentes mediadores inflamatórios, e a pleurisia, induzida pela carragenina.

## **1.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO NOS MODELOS DA PLEURISIA E EDEMA DE PATA INDUZIDOS PELA CARRAGENINA**

O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo bastante utilizado no estudo do papel de diferentes mediadores envolvidos com a inflamação aguda. A primeira fase da formação de edema de pata induzido pela carragenina, em ratos ocorre de 1 a 2 horas após a injeção do agente flogístico, e é caracterizada pela liberação de histamina, serotonina (5-HT), bradicinina, PAF (platelet activating factor) e substância P (SP) (Di Rosa *et al.*, 1971; Gilligan *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 1986). A segunda fase ocorre de 3 a 4 horas após a administração do agente flogístico, é mantida pela liberação de prostaglandinas (Di Rosa & Willoughby, 1971). Além disto estudo mostram que o NO promove o aumento da síntese de prostaglandina favorecendo a inflamação (Sautebin *et al.*, 1995). Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de entender-se o papel de cada mediador no processo inflamatório. Sabe-se atualmente que muitos destes mediadores como histamina, 5-HT, bradicinina, PAF e prostaglandinas são potentes vasodilatadores e alguns são capazes de exercerem seus efeitos através da migração de neutrófilos. Vários destes mediadores como, por exemplo, histamina e substância P são capazes de ativar o endotélio vascular, a liberar mediadores que por ventura promovam aumento da liberação de citocinas (Maruo *et al.*, 1992; Paegelow *et al.*, 1995; Cocciara *et al.*, 1997) e parcialmente pela indução da expressão de moléculas de adesão (Miki *et al.*, 1996, Saban *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1998).

Poucos estudos têm sido demonstrados sobre os mediadores implicados no edema de pata induzido pela Cg em camundongo, mas tem sido demonstrado que a bradicinina, substância P e prostaglandinas estão implicadas (Campos *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2000; Ueno *et al.*, 2000). O modelo estudado é importante para *screening* de drogas antiinflamatórias usando estes modelos mostram perfis semelhantes (Sugishita *et al.*, 1981). O edema de pata induzido pela carragenina em camundongos foi utilizado em nossos estudos para a avaliação da ação antiedematogênica do PK11195 e Ro5-4864 e, em seguida, para tentarmos entender o mecanismo de ação dos ligantes do PBR neste modelo. A inibição do edema de pata de camundongos induzida por diferentes mediadores implicados no processo inflamatório induzido pela carragenina, tais como: histamina, 5-HT, bradicinina, PAF, substância P e prostaglandinas, foi também estudada. A capacidade dos ligantes do PBR em inibirem a ação do óxido nítrico no edema, foi analisada através da capacidade destes ligantes em inibirem o edema de pata induzido pela L-arginina, um substrato para geração de NO.

O segundo modelo utilizado neste estudo foi à pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Este modelo é caracterizado pelo aumento de migração celular, principalmente de neutrófilos, 4 horas após a injeção de carragenina. Não se conhecem todos os mediadores inflamatórios envolvidos neste modelo, mas sabe-se que a bradicinina e a substância P participam na formação do exsudato, e que o efeito das cininas é associado com a ativação do receptores B1e B2 das cininas (Salleh *et al.*, 1996; Vianna et Calixto ,1998). A migração de neutrófilos na pleurisia induzida pela carragenina em ratos parece ser devido a liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-13 (Oh-ishi *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 1998), enquanto as cininas e as prostaglandinas devem ser os principais mediadores envolvidos no extravasamento plasmático (Oh-ishi *et al.*, 1989). Este modelo de inflamação aguda na cavidade pleural foi utilizado para confirmarmos a atividade antiinflamatória dos ligantes do PBR em um modelo inflamatório diferente do primeiro, permitindo-nos também observar além da exudação a alteração na celularidade e dosagens de citocinas.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1 - Analisar, os efeitos antiedematogênica do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata, induzido pela carragenina em camundongo.

2 - Avaliar a ação do PK11195 e Ro5-4864 no modelo do edema de pata induzido por diferentes mediadores inflamatórios, para caracterizar a o mecanismo de ação desses ligantes.

3 - Avaliar o efeito da interleucina-13 (IL-13) na atividade antiedematogênica do PK11195 e Ro5-4864 no edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.

4 - Analisar a atividade antiinflamatória dos ligantes PBR (PK11195 e Ro5-4864) utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, onde os parâmetros analisados serão a migração celular, o extravasamento plasmático e a dosagem de citocinas IL-6 e IL-13 na cavidade pleural de camundongos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS**

Neste estudo foram utilizados camundongos albinos suíços, machos, (20 - 30g), fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB - UFSC, em temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, em ciclo claro/escuro de 12 h, com acesso a água e ração ad libitum. Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 h e foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com os animais de laboratório (Zimmermann, 1983).

#### **3.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

##### **3.2.1. EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGOS**

Para este experimento, foram utilizados camundongos machos de (25 -30g) e o volume da pata foi determinado através do aumento do peso promovido pela imersão da pata até a articulação tíbio-társica em um becker contendo uma solução 2,5 % de lauril sulfato de sódio, colocado sobre uma balança eletrônica (Marte®,USA). As variações do volume das patas foram registradas numericamente pela balança nos tempos zero (antes da injeção do agente flogístico) e após 30, 60, 120 e 240 minutos. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E. P. M. da diferença de volume da pata posterior direita injetada com carragenina e mediadores

inflamatórios; e da pata posterior esquerda injetada com o veículo (salina tamponada com fosfato/PBS; composição em mM/litro).

### **3.2.1.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PK11195 E Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

Para se determinar o melhor tempo de pré-tratamento os animais receberam PK11195 ou Ro5-4864 na dose de 0,1 mg/kg antes da injeção de carragenina, em diferentes tempos: 1 h; 6 h; 12 h; 24 h e 48 h.

Outros grupos de animais foram tratados com diferentes doses de PK11195 ou Ro5-4864 (0,00001; 0,001; 0,1; 10; mg/kg; i.p.) administradas 24 h antes da administração de Carragenina para se determinar a melhor dose de pré-tratamento.

Os animais receberam por via intraperitoneal (i.p.) 0,2 ml de uma solução de PBS contendo PK11195 ou Ro5-4864. Camundongos do grupo controle receberam 0,2 ml de PBS e os animais controle positivos receberam uma solução de PBS, contendo indometacina (10mg/ Kg, i.p.) dissolvida em bicarbonato de sódio p/v (5%).

Os animais do grupo controle positivo foram tratados com indometacina (5 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes do experimento.

Após o tratamento prévio (24h) com as drogas, os animais receberam uma injeção intraplantar de 300 µg carragenina (Cg), diluídos em 0,05 ml de PBS, na pata posterior direita e o mesmo volume de PBS na pata posterior esquerda que foi utilizada como controle. A diferença de volume entre as patas foi considerada como índice de edema. Procedeu-se então de acordo com protocolo do item 3.2.1.

### **3.2.1.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PK11195 SOBRE A ATIVIDADE DO Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

Para avaliar um possível efeito antagônico ou sinérgico do PK11195 sobre o efeito do Ro5-4864, no modelo experimental do edema de pata induzido pela Cg, o PK11195 (0,1 mg/kg; i.p.) foi administrado 1 h e 24h antes do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.). O Ro5-4864 foi administrado 1 e 24 horas antes da injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata). Procedeu-se então de acordo com protocolo do item 3.2.1.

### **3.2.1.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PK11195 E DO Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS ADRENALECTOMIZADOS**

A interferência dos glicocorticóides da adrenal no efeito antiinflamatório do PK11195 e Ro5-4864, foi analisado fazendo-se adrenalectomia bilateral em animais anestesiados com éter etílico (Flower *et al.*, 1989).

Os animais falso-operados (controle positivo) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sem no entanto serem removidas as adrenais. Após as cirurgias os animais adrenalectomizados (ADL) receberam salina (0,9 %; v.o) ad libitum a fim de serem evitados os efeitos da ausência dos mineralocorticóides, e os falso-operados (FO) água potável.

Decorrida uma semana do procedimento cirúrgico, os animais ADL e FO foram tratados com veículo PBS (0,1 ml/10g; i.p.) ou com Ro5-4864 e PK11195 (0,1

mg/kg; i.p.) 24 h antes do experimento. Depois de decorrido este tempo os animais receberam uma injeção de 0,05 ml de Cg (300 µg/pata) na região intraplantar da pata posterior direita e o mesmo volume de PBS na pata posterior esquerda que foi utilizada como controle. Procedeu-se então de acordo com protocolo do item 3.2.1.

#### **3.2.1.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PK11195 E DO Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DIFERENTES MEDIADORES, EM CAMUNDONGOS**

O efeito dos ligantes do PBR também foram avaliados no modelo de edema de pata induzido por diferentes mediadores, liberados durante o edema de pata induzido pela carragenina, desta forma diferentes grupos de animais receberam tratamento prévio com os ligantes do PBR, PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.), 24 h antes da injeção intraplantar na pata posterior direita de 0,05ml de PBS contendo serotonina (10 nmol/pata), histamina (100 nmol/pata), substância P (10 nmol/pata), bradicinina (3 nmol/pata), prostaglandina E2 (30 nmol/pata) ou PAF (10 nmol/pata). O edema foi medido nos tempos de: 15, 30, 45, 60 e 120 min após a injeção de serotonina, histamina e substância P; 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 min após a injeção de bradicinina; 30, 60, 120 e 240 min após a injeção de prostaglandina E2 e PAF. No experimento em que se utilizou a bradicinina, os animais foram tratados previamente com inibidor das cininase II, o captopril (5mg/kg, 1h, i.p), a fim de prevenir a degradação do peptídeo (Corrêa e Calixto, 1993).

Os animais do grupo controle foram tratados com 0,1ml/10g i.p de PBR, 24h antes da injeção intraplantar dos diferentes mediadores do processo inflamatório.

### **3.2.1.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO PK-11195 E DO Ro-54864 EM INIBIR A AÇÃO EDEMATOGÊNICA DO ÓXIDO NÍTRICO, NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Para avaliar a capacidade de modulação dos ligantes PBR sobre o efeito edematogênico do óxido nítrico diferentes grupos de animais foram tratados previamente ou não com PK11195 ou Ro5-4864 (0,1mg/kg; i.p.), 24 h antes de receberem uma injeção intraplantar de 0,05 ml de uma solução de carragenina (300µg) contendo L-arginina (15 µmol, precursor do NO), ou L-NAME (15 µmol, inibidor da óxido nítrico sintase). A medida do edema procedeu-se de acordo com o protocolo do item 3.2.1.

Os animais do grupo controle receberam somente carragenina (300µg) intraplantar na presença de PBS.

### **3.2.1.6. PARTICIPAÇÃO DA INTERLEUCINA – 13 (IL-13) NA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO PK11195 E DO Ro5-4864 NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

O efeito da Interleucina-13 (IL-13) na atividade antiedematogênica do PK11195 e do Ro5-4864 foi analisado em animais pré-tratados com PK11195 ou Ro5-4864 (0,1mg/kg/i.p.) 24 h antes da Cg. A injeção intraplantar de IL-13, nas doses de 1; 10 e 100 pmol/pata foi analisada 5 min antes da injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata).

Neste mesmo protocolo experimental, a injeção intraplantar de IL-13 na dose de 10 pmol/pata também foi realizada 10 minutos antes ou co-injetada com

carragenina (300 µg). A medida do edema procedeu-se de acordo com o protocolo do item 3.2.1.

### **3.2.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PK11195 E DO Ro5-4864 NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS (4h)**

#### **3.2.2.1. INDUÇÃO DA PLEURISIA**

Os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e receberam injeção intrapleurial (i.t) de 0,1 ml de salina tamponada com fosfato (PBS) contendo carragenina 1% (1 mg/cavidade), através da introdução de uma agulha 13x5 nm canulada com polistireno no espaço intercostal, no lado direito da cavidade torácica, de acordo com a técnica descrita por (Spector, 1956) e adaptada para camundongos por (Henriques *et al.*, 1990). Os animais do grupo controle receberam uma injeção intrapleurial (i.t) de 0,1 ml de salina tamponada com fosfato (PBS) estéril.

#### **3.2.2.2. QUANTIFICAÇÃO DO EXSUDATO**

Uma hora antes da indução da pleurisia pela carragenina todos os animais foram submetidos a uma injeção de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml, i.v.) para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (Henriques *et al.*, 1990; Saleh *et al.*, 1996; 1998).

De acordo com protocolo experimental, quatro horas após a administração do agente flogístico os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo (1, 12 e 24h) com uma overdose de éter etílico. A seguir, os animais foram fixados em

mesa cirúrgica, em declive de 30 a 45 °C sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e feita a abertura da cavidade pleural por uma incisão do diafragma. Posteriormente, a cavidade pleural dos animais foi lavada com 1,0 ml de solução (PBS - pH 7,6) associado com heparina (20 UI/ml). O volume foi coletado com ajuda de uma pipeta automática. Foram estocados 0,5 ml de cada amostra em freezer (-20 °C) para posterior determinação da concentração de azul de Evans. No dia da realização da análise as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e o azul de Evans quantificado através de espectrofotômetro (Hitachi U-2001-USA) em comprimento de onda 600 nm. Para quantificar o extravasamento plasmático contido nas amostras, suas densidades óticas foram comparadas às de uma curva padrão de azul de Evans, com concentrações conhecidas e crescentes variando entre (0,5 e 10 µg/ml). Através da regressão linear, foi obtida uma equação da reta definida pelas densidades óticas da curva padrão, e todos os valores de absorbâncias medidos das amostras foram submetidos a esta equação.

### **3.2.2.3. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS**

No dia dos experimentos, uma alíquota do lavado foi reservada para a contagem celular. A contagem do número total de células presente no exsudato foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico (aumento 400 vezes), para tal, uma amostra de 10 µl do exsudato foi diluída em líquido de Turk 200 µl (1:20). A partir de uma outra alíquota (100 a 150 µl), o volume coletado foi destinado à realização de esfregaços celulares. A contagem diferencial das células foi feita através da confecção de lâminas com amostras do exsudato em centrífuga

(Cytospin 3, Shandon). Em seguida, as lâminas foram coradas com corante (Panótico), e analisadas em microscopia óptica utilizando objetiva de imersão. Os resultados foram expressos pelo número de cada população de células por  $\times 10^6$ .

Diferentes grupos de animais foram tratados com PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) ou PBS 0,1 ml/10g, nos tempos de 1 h, 12 h e 24 h antes da indução da pleurisia. Os ligantes PBR foram administrados 24 h antes da indução da pleurisia, na dose de 0.01 mg/kg i.p. Para controle positivo, grupos de animais foram tratados com indometacina (5 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes da injeção do agente flogístico.

#### **3.2.2.4. EFEITO DOS LIGANTES PBR NOS NÍVEIS DE IL-6 E IL-13 NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

Para quantificar os níveis de IL-6 e IL-13 no exsudato pleural diferente grupos de animais foram tratados por via intraperitoneal com PBS (0,1 ml/10 g, grupo controle), ou com PK11195 ou Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.), 24 h antes da indução da pleurisia pela carragenina, procedendo-se como descrito anteriormente no item 3.2.2; à exceção que os animais não receberam previamente azul de Evans. Os exsudatos foram coletados e acondicionados em tubos de polietileno e em freezer.

Os níveis de IL-6 e IL-13 foram medidos pela equipe de Dr Pascual Ferrara da Sanofi Recherche Labège (França) através da metodologia que são utilizadas células hibridona da linhagem B9 (Aarden *et al.*, 1987) e B-9-1-3 de célula B-murine. dependente de IL-6 e IL-13 (Bouteiller *et al.*, 1995). Soluções padrão de IL-6 e IL-13 diluídas duas vezes ou diferentes amostras da cavidade pleural foram transferidas para placas de 96 escavações contendo  $10^4$  células/poços. Após 72 h de cultura 3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- dipheenylnitrotetrazolim bromide (Sigma, St.

Louis, MO, USA) foram adicionadas a cada poço na concentração de 5 mg/ml. Depois de incubação durante 4 h a 37 °C; 0,1 ml de ácido hidrocloreto de isopropanol 0,04 N foi adicionado em todos os poços e homogeneizado. Após a incubação durante alguns minutos à temperatura ambiente, a absorbância dos poços foi medida em espectrofotômetro de 565 nm, e comparados com curvas padrões. As dosagens foram feitas em triplicata, sendo que a sensibilidade do método de 5 pg/ml.

### **3.3. DROGAS E REAGENTES**

No estudo aqui relatado, utilizaram-se as seguintes drogas: PK11195 e Ro5-4864 cedidas pela Sanofi Recherche Labégé (França), éter etílico (Reagem, Brasil) bradicinina, captopril, carragenina Lâmbda (grau IV), substância P, histamina, serotonina, prostaglandina E2, PAF-acéter, indometacina, azul de metileno, azul de Evans, solução salina (NaCl 0,9%), corante Giemsa e May-Grunward-Giemsa, foram comprados na Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA, solução tampão fosfato (PBS-pH 7,6: NaCl 137mM, KCl 2mM e tampão fosfato 10mM (Merck, Brasil), Heparina (Liquemine ®, Roche, Brazil). Os reagentes utilizados foram obtidos de diferentes fontes comerciais: Recombinant camundongo IL-13, Dulbeccos's modificado, RPMI 1640 Life Technologies, nc. (Paisley, Scotland). A linhagem de células foi através da American Type Culture Collection.

As soluções estoques dos ligantes PBR foram preparadas com etanol P.A. e indometacina foi diluída em PBS e bicarbonato de sódio a 5%. No dia dos experimentos as drogas foram diluídas em PBS.

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), exceto as DI50 (dose dos ligantes PBR que produziram 50% de redução do edema de pata induzido pela carragenina em relação aos respectivos valores dos seus controles), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett, Tukey-Kramer ou Teste T Student quando necessário. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

As percentagens de inibição para o grupo tratado em relação ao controle foram calculadas através da área sob a curva (Peters, tese de mestrado, 1997).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1. EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO PK11195 E Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS

Para avaliarmos o perfil da ação antiinflamatória dos ligantes PBR, os animais receberam (0,1 ml/10 g i.p) PK11195 e Ro5-4864 em diferentes tempos (1 a 24 h), para um estudo de tempo-resposta, e diferentes doses (0,00001 a 10 mg/kg, i.p.) para um estudo de dose-resposta.

O tratamento prévio com PBS (0,1 ml/10 g; i.p.), não alterou a resposta da injeção intraplantar de carragenina, que promoveu a formação de um edema progressivo, que em 240 min após a injeção do agente flogístico foi de  $107,0 \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$  ml ( $p > 0,01$ ) (Figura 1 e Tabela 1).

Nas mesmas condições experimentais, o animais receberam PK11195 (0,1mg/kg; i.p.) nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas antes da carragenina. Os resultados demonstraram que esta droga foi efetiva em inibir significativamente o edema de pata em (% de inibição) 40,6%; 35,6%; 44,1% e 51,5% para os respectivos tempos. ( $p < 0,05$ ) (Figura 1 e Tabela 1). O PK11195 quando injetado 48 horas antes da Cg, não inibiu o edema de pata induzido pela carragenina (resultados não mostrados).

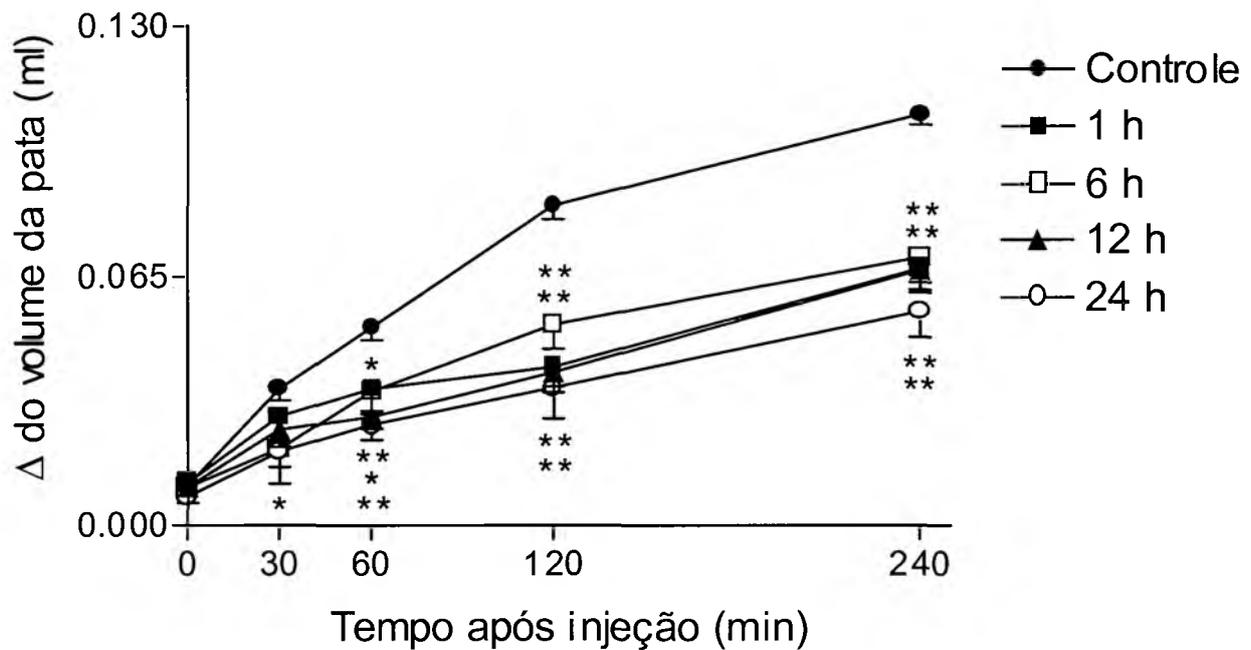
No estudo do tempo resposta do PK11195 foi observado, que em 24 h ocorreu a melhor inibição do edema, razão da escolha deste tempo para o estudo da dose-resposta. Os animais foram tratados com PK11195, 24 h antes da carragenina,

nas doses de 0,00001; 0,001; 0,1 e 10 mg/kg i.p. Os resultados mostraram que o PK11195 inibiu significativamente de maneira dose-dependente o edema de pata em (% de inibição) 19,6%; 28,7%; 48,9% e 78,8%; para as respectivas doses ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 2 e Tabela 2), sendo que o valor estimado da  $DI_{50}$  foi de 0,009 (95% limite de confiança = 0,0076 – 0,013) mg/kg.

Em outro grupo de animais foi administrado Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) nos tempos de 1, 6, 12, 24 horas antes da injeção de carragenina e observou-se, que o Ro5-4864 inibiu significativamente o edema de pata (% de inibição) 35,7%; 29,4%; 28,1% e 52,5%, para os respectivos tempos. ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) (Figura 3 e Tabela 3). O tratamento prévio 48 horas antes do agente flogístico, não interferiu no edema de pata induzido pela carragenina (resultados não mostrados).

No tempo de 24 h ocorreu a melhor inibição do edema de pata pelo Ro5-4864, razão pela qual foi feita a escolha deste tempo para estudo da dose-resposta. Quando foram tratados, 24 h antes da carragenina, com Ro5-4864 (0,0001; 0,001; 0,1 e 10 mg/kg; i.p.), ocorreu uma inibição significativa de maneira dose dependente no edema de pata de (% de inibição) 22,7%; 47,0%; 63,0% e 80,0% para as respectivas doses ( $p < 0,01$ ) (Figura 4 e Tabela 4). O valor da  $DI_{50}$  estimada para este tratamento foi de 0,004 (95% limite de confiança 0,0025 - 0,0086) mg/kg.

O grupo controle positivo o tratamento dos animais com indometacina (10 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes do agente flogístico, inibiu de maneira significativa o edema de pata em 57,8% ( $p < 0,01$ ) (Tabela 2 e 4)



**Figura 1** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado nos tempos de 1, 6, 12, 24 horas antes da injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata - controle) em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 11 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle \*  $p < 0,05$  ou \*\*  $p < 0,01$ .

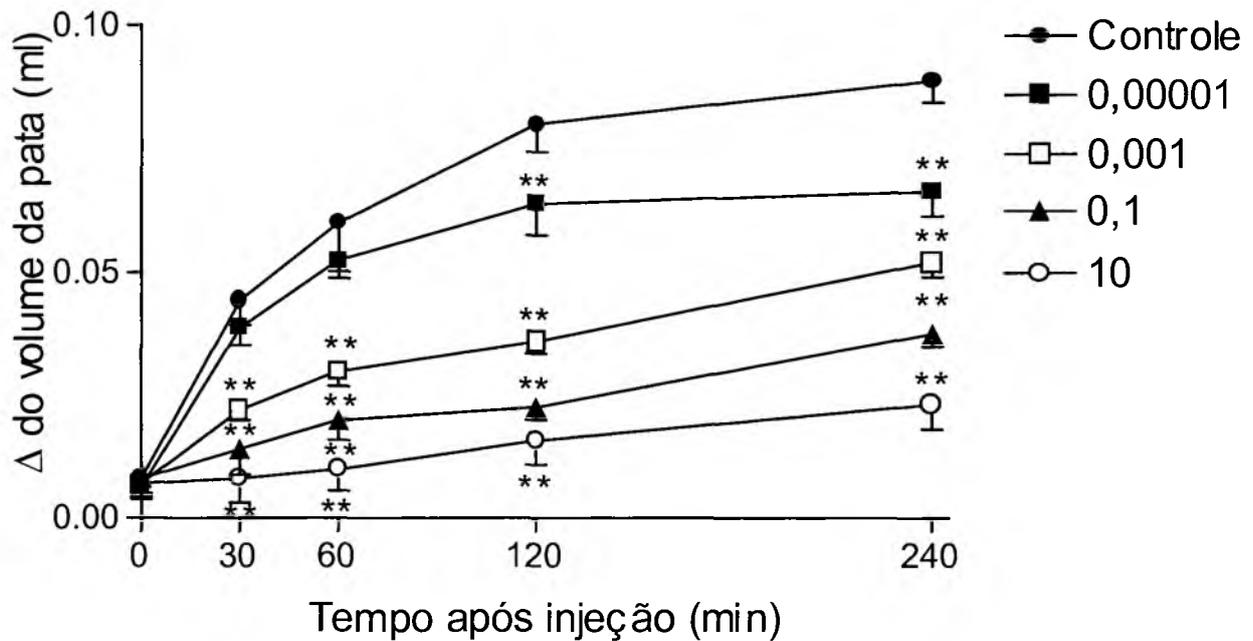
**Tabela 1** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (0,1 mg/kg; i.p.), quando administrado 1, 6, 12 e 24 horas antes da injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata), em camundongos.

Grupos	Tempo (h)	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> Inibição do edema (%)
		30 min	60 min	120 min	240 min	
Controle		35,7±2,9	51,7±3,2	83,5±3,5	107,0±2,5	0,0
PK11195	1	28,6±7,9	35,7±6,4 *	41,3±6,7 **	67,1±3,6 **	40,6
	6	20,0±9,1	35,0±5,0 *	52,5±6,2 **	70,0±9,1 **	35,6
	12	25,0±3,0	28,0±3,0 **	40,0±4,0 **	66,7±5,0 **	44,1
	24	19,2±4,0 *	26,3±4,0 **	36,0±8,1 **	56,0±6,8 **	51,5

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \* p<0,05 ou \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 2** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (0,00001; 0,001; 0,1 e 10 mg/kg; i.p.) quando administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata - controle) em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 11 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle \*\*  $p < 0,01$ .

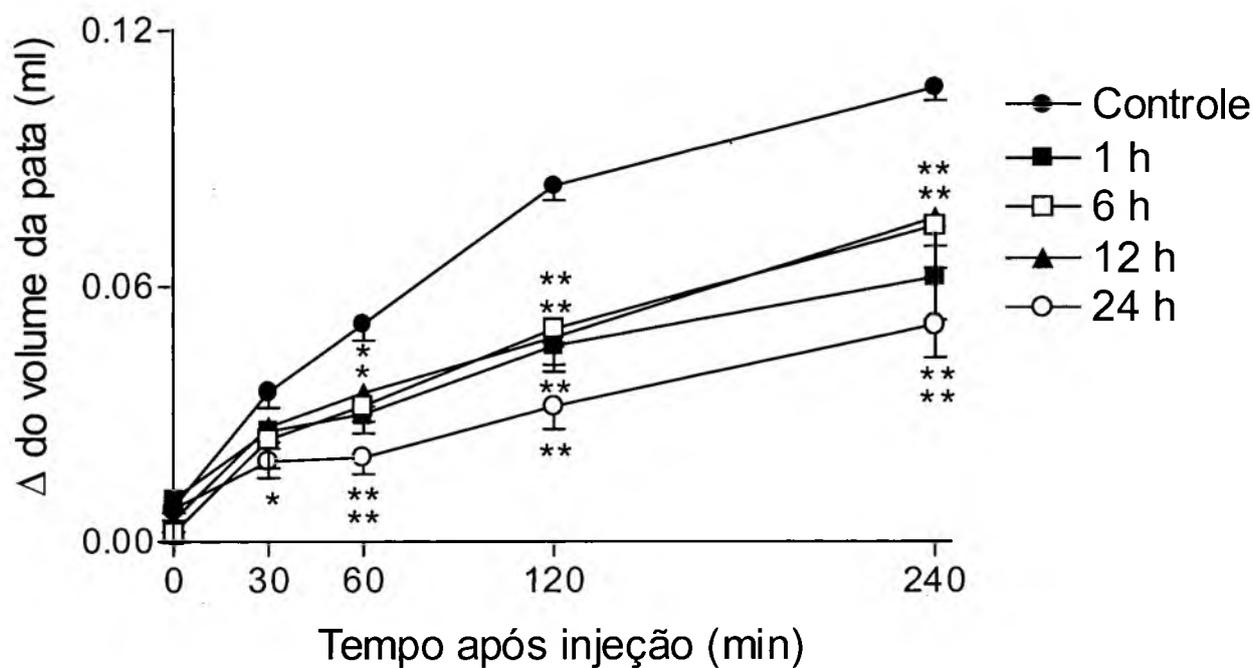
**Tabela 2** - Efeito antiedematogênico do PK11195 nas doses de (0,00001; 0,001; 0,1 e 10 mg/kg; i.p.), quando administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata), em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> Inibição do edema (%)
		30 min	60 min	120 min	240 min	
Controle		33,6±4,5	54,5±4,9	72,7±3,8	97,2±5,2	0,0
PK11195	0,00001	38,7±3,5	52,5±3,6	63,7±6,2 **	66,2±4,9 **	19,6
	0,001	22,0±2,0**	30,0±3,2 **	36,0±2,4 **	52,0±3,0 **	28,7
	0,1	14,0±5,1**	20,0±4,1 **	22,5±2,5 **	37,5±2,5 **	48,9
	10	08,0±4,8 **	10,0±4,3 **	15,7±4,8 **	23,1±5,0 **	78,8
Indometacina	10	28,6±2,6**	25,7±2,0 **	28,5±2,6 **	27,1±4,7 **	57,8

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 3** - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) quando administrado nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas antes da injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata - controle) em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 11 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle \*  $p < 0,05$  ou \*\*  $p < 0,01$ .

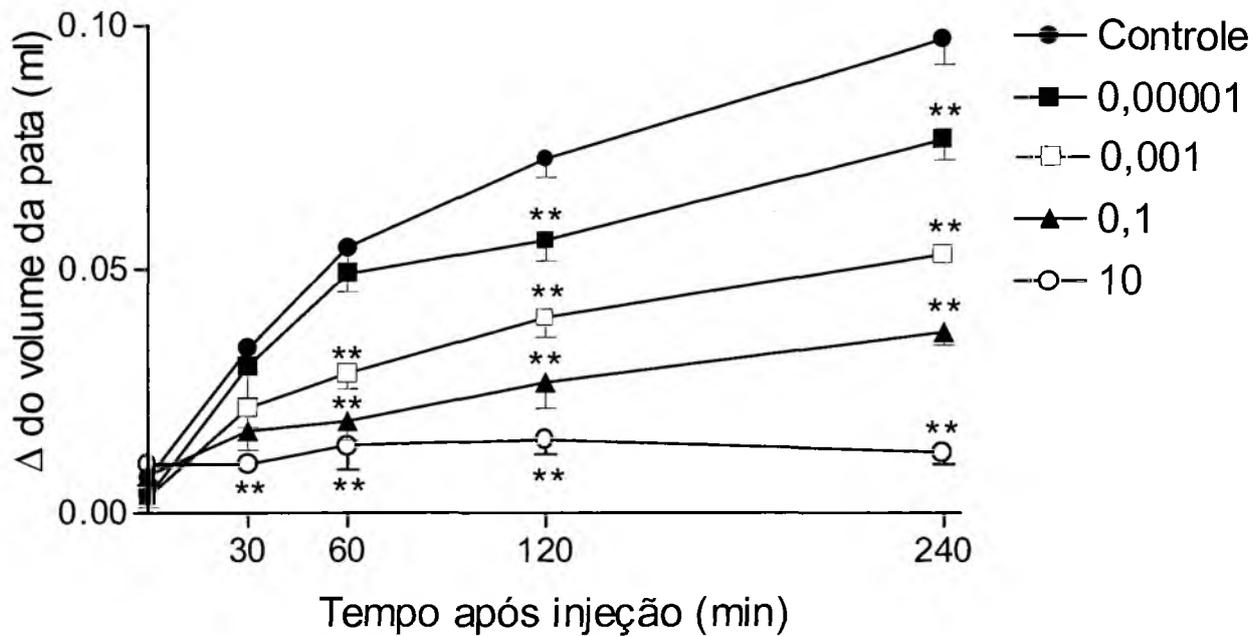
**Tabela 3** - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) quando administrado nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas, antes da injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata), em camundongos.

Grupos	Tempo (h)	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
		30 min	60 min	120 min	240 min	
Controle		35,7±2,9	51,7±3,2	83,5±3,5	107,0±2,5	0,0
Ro5-4864	1	26,0±4,0	30,0±4,4 **	46,0±6,0 **	62,0±4,0 **	35,7
	6	24,0±6,7	32,0±3,7 *	50,0±3,1 **	74,0±4,5 **	29,4
	12	27,0±3,6	35,0±3,2 *	48,0±6,4 **	76,0±4,7 **	28,1
	24	18,8±3,8 *	19,8±3,9 **	31,8±5,3 **	51,0±7,4 **	52,5

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \*p<0,05 ou \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 4** - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 (0,00001; 0,001; 0,1 e 10 mg/kg; i.p.) quando administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata - controle) em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 11 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle \*\*  $p < 0,01$ .

**Tabela 4** - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 nas doses de (0,00001; 0,001; 0,1 e 10 mg/kg; i.p.) quando administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300µg/pata), em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
		30 min	60 min	120 min	240 min	
Controle		33,6±4,5	54,5±4,9	72,7±3,8	97,2±5,2	0,0
Ro5-4864	0,00001	30,2±6,6	49,0±3,6	56,0±4,2 **	76,6±4,2 **	22,7
	0,001	21,6±4,0	28,6±3,0 **	40,1±4,0 **	53,0±1,6 **	47,0
	0,1	16,8±3,8	18,8±3,8 **	26,8±5,3 **	37,1±2,6 **	63,0
	10	10,0±0,0 **	14,0±5,0 **	15,0±2,8 **	12,5±2,5 **	80,0
Indometacina	10	28,6±2,6	25,7±2,0 **	28,5±2,6 **	27,1±4,7 **	57,8

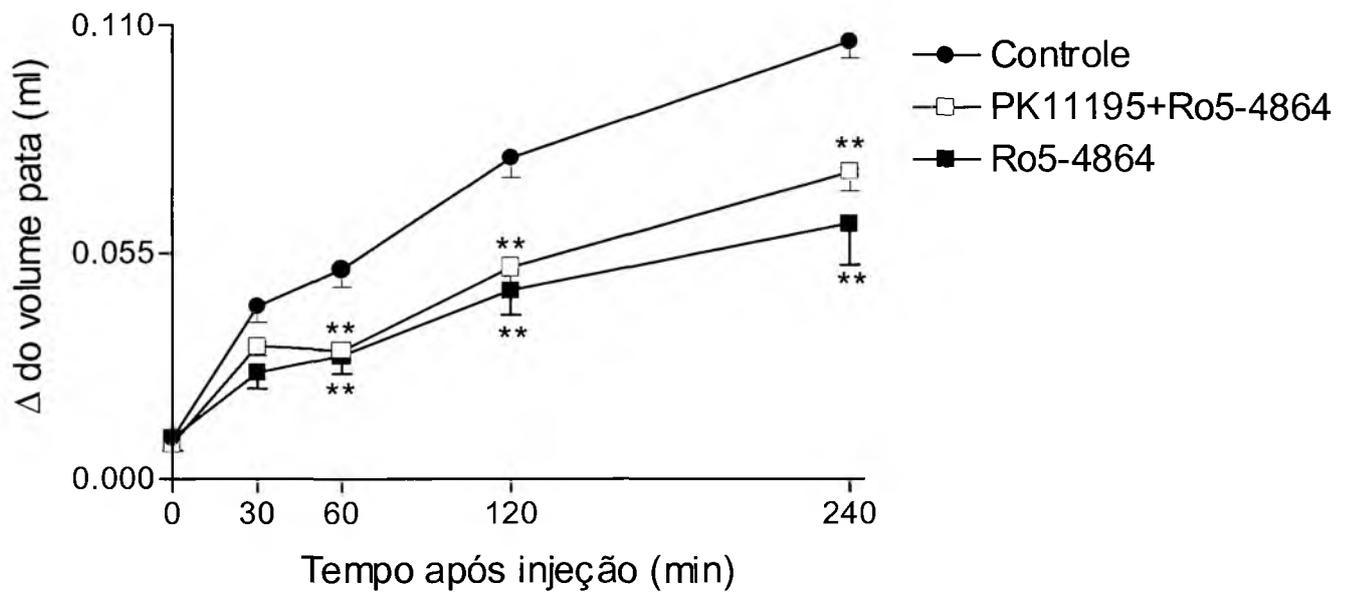
<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \*\*p<0,01.

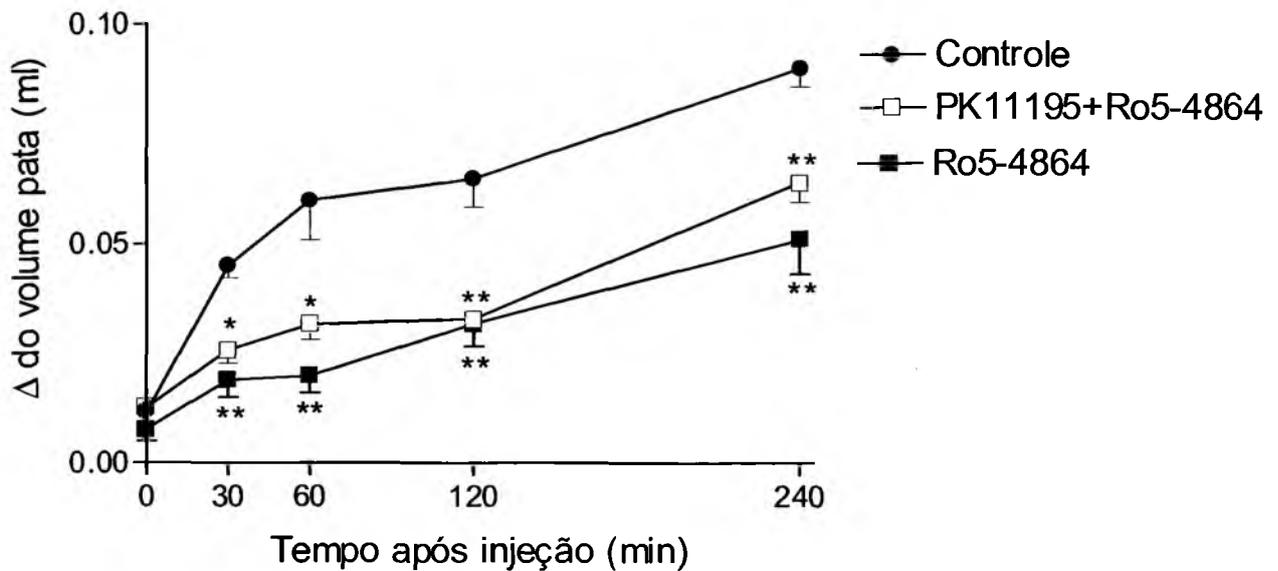
<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.

#### **4.2. EFEITO DO PK11195 SOBRE A ATIVIDADE DO Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.**

O tratamento prévio do PK11195 (0,1 mg/kg; i.p.), 1h antes do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.), não interferiu na atividade antiedematogênica do Ro5-4864, quando este ligante do PBR foi administrado 1 hora (Figura 5) e 24 horas (Figura 6) antes do agente flogístico. Assim não foi observado nenhum efeito de antagonismo, sinergismo e nem de potenciação do PK11195 sobre o Ro5-4864 (Figura 5 e 6).



**Figura 5** - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata - controle) na presença ou ausência do tratamento prévio de PK11195 (0,1 mg/kg; i.p.) 1 hora antes do Ro5-4864. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle \*\*  $p < 0,01$ .

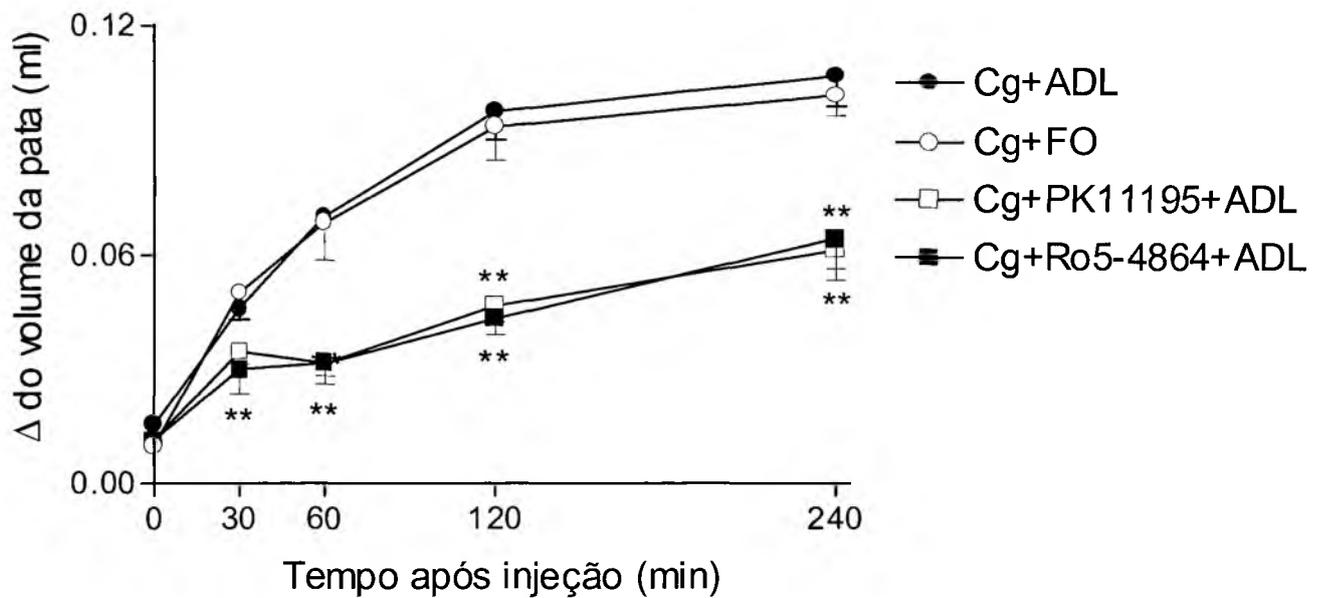


**Figura 6** - Efeito antiedematogênico do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/pata - controle) na presença ou ausência do tratamento prévio de PK11195 (0,1 mg/kg; i.p.) 1 hora antes do Ro5-4864. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 10 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle \*  $p < 0,05$  ou \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.3. EFEITO DO PK11195 E DO Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS ADRENALECTOMIZADOS

Nos animais adrenalectomizados (ADL) ou falsos operados (FO) tratados com veículo (PBS) por via i.p, a administração intraplantar de carragenina (300 µg/pata) promoveu a formação de um edema progressivo, que 240 min após a injeção do agente flogístico foi de  $106,6 \pm 8,8 \cdot 10^{-3}$  e  $101,7 \pm 5,4 \cdot 10^{-3}$  ml, respectivamente (tabela 5).

O tratamento prévio dos animais com PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) 24h antes do experimento, inibiu respectivamente o edema induzido pela carragenina em 47,2% e 48,4%. ( $p < 0,01$ ) (Figura 7 e Tabela 5).



**Figura 7** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (Cg) (300  $\mu$ g/pata) em camundongos adrenalectomizados (ADL) e falso operados (FO). Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 a 11 animais). Difere significativamente do grupo controle (ADL+Cg) \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,01$ .

**Tabela 5** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) e do Ro5-4864 (Ro5) (0,1 mg/kg; i.p) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) em camundongos adrenalectomizados (ADL) ou falso operados (FO).

Grupos	Tempo (h)	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
		30 min	60 min	120 min	240 min	
Cg+FO	24	50,0±0.0	68,3±9,8	93,3±8,8	101,7±5,4	0.0
Cg+ADL	24	46,6±3.3	70,0±1,1	97,5±7,5	106,6±8,8	0.0
Cg+ADL+PK	24	34,6±3.3 *	31,6±3,3 **	46,6±4,2 **	61,0±7,6 **	47.2
Cg+ADL+Ro5	24	30,0±6.3 **	31,6±5,4 **	43,3±4,2 **	64,1±7,9 **	48.4

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle (ADL+Cg) \*p<0,05 ou \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.

#### 4.4. EFEITO DO PK11195 E Ro5-4864 NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DIFERENTES MEDIADORES, EM CAMUNDONGOS

Os resultados a seguir mostram o efeito do PK11195 ou Ro5-4864 administrados (0,1 mg/kg i.p.) 24 h antes da injeção intraplantar diferentes mediadores que são liberados durante o edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina: histamina (100 nmol/pata), bradicinina (BK) (3 nmol/pata), substância P (SP) (10 nmol/pata), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (30 nmol/pata), fator ativação plaquetária (PAF-acéter) (10 nmol/pata), serotonina (5-HT) (10 nmol/pata). Estes resultados foram expressos como percentagem de inibição, calculada através da área sobre a curva.

A inibição significativa do edema de pata induzido pela histamina (100 nmol/pata) foi de 65,2% e 65,4% para os animais pré-tratados, respectivamente com PK11195 (0,1 mg/kg i.p.) e Ro5-4864 (0,1 mg/kg i.p.). ( $p < 0,01$ ) (Figura 8 e Tabela 6).

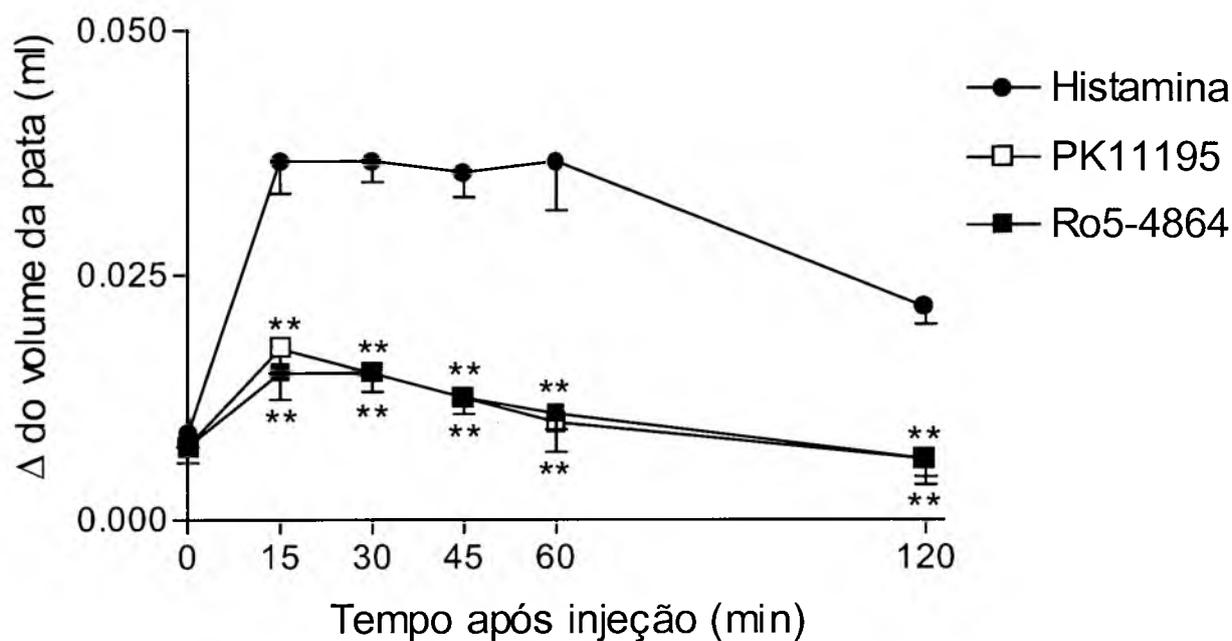
Nos animais tratados previamente com PK11195 (0,1 mg/kg i.p.) e Ro5-4864 (0,1 mg/kg i.p.) ocorreu uma inibição significativa do edema de pata induzido por BK (3 nmol/pata) de 48,3% e 50,1% respectivamente. ( $p < 0,01$ ) (Figura 9 e Tabela 7).

Quando receberam PK11195 (0,1 mg/kg i.p.) a inibição do edema de pata induzido por SP (10 nmol/pata) foi de 46,3%. e para animais pré-tratados com Ro5-4864 (0,1 mg/kg i.p.) foi de 46,6% ( $p < 0,01$ ) (Figura 10 e Tabela 8).

O pré-tratamento com PK11195 (0,1 mg/kg i.p.) provocou uma inibição de 63,7% no edema de pata induzido por PGE<sub>2</sub> (30 nmol/pata) e nos animais que previamente receberam Ro5-4864 (0,1 mg/kg i.p.) foi de 49,4%. ( $p < 0,01$ ) (Figura 11 e Tabela 9).

O edema de pata induzido pelo PAF (10 nmol/pata) foi inibido tanto pelo PK11195 (0,1 mg/kg i.p.) em 34,9%, como pelo Ro5-4864 (0,1 mg/kg i.p.) em 40,9%. ( $p < 0,01$ ) (Figura 12 e Tabela 10).

Os animais pré-tratados com PK11195 e Ro5-4864 não foram capazes de inibir o edema de pata induzido pela 5-HT (10 nmol/pata) (Figura 13).



**Figura 8** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de histamina (100 nmol/pata). Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6 a 11 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle (histamina) \*\*  $p < 0,01$ .

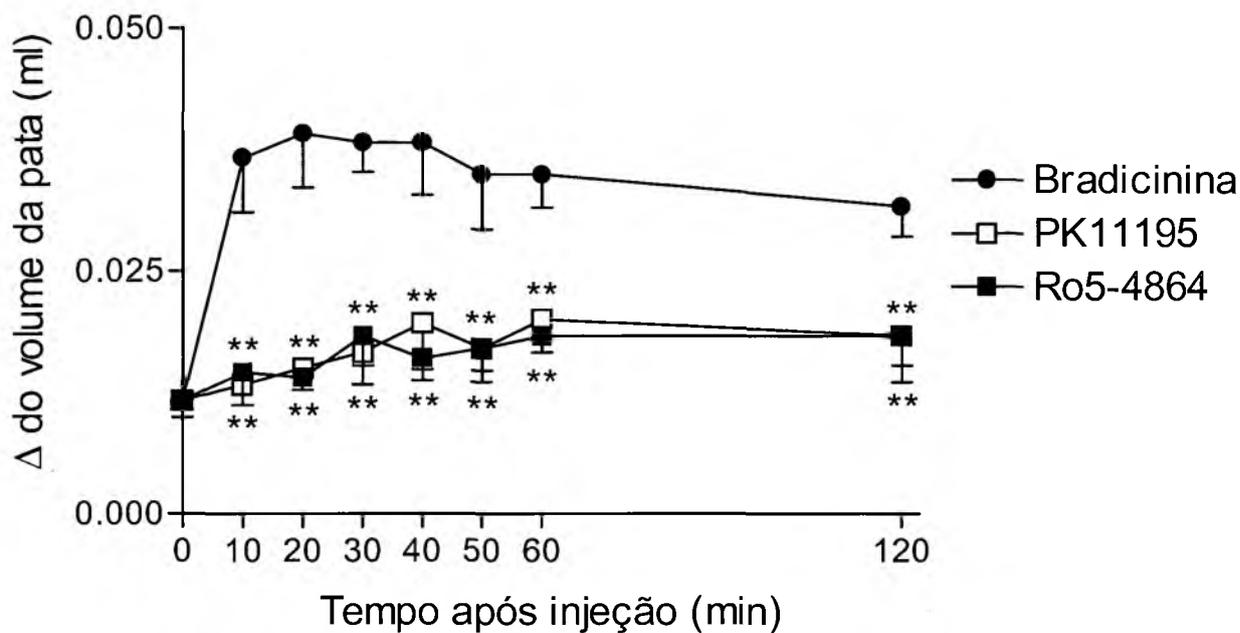
**Tabela 6** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de histamina (100 nmol/pata) em camundongos.

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata induzido por histamina (10 <sup>-3</sup> ml)					<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	
Histamina	36,7±3,3	36,7±2,1	35,5±2,4	36,7±5,0	21,7±1,7	0.0
PK 11195	17,5±2,5 **	15,0±1,9 **	12,5±1,6 **	10,0±3,0 **	6,3±1,8 **	65.2
Ro5-4864	15,0±2,7 **	15,0±1,9 **	12,5±1,6 **	10,9±1,6 **	6,2±2,6 **	65.4

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 9** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de bradicinina (3 nmol/pata). Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 a 11 animais). Difere significativamente do grupo controle (bradicinina) \*\* $p < 0,01$ .

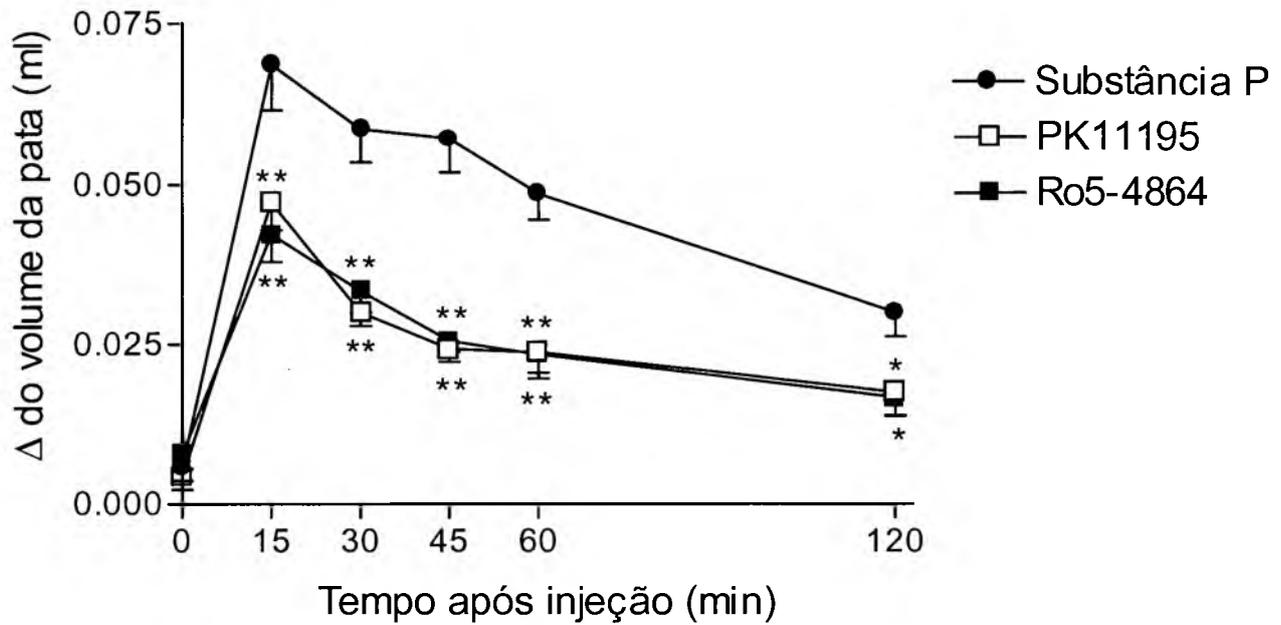
**Tabela 7** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) e Ro5-4864 (Ro5) (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de bradicinina (BK) (3 nmol/pata) em camundongos.

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata induzido pela bradicinina ( $10^{-3}$ ml)							<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min	120 min	
BK	36,7±5,6	39,2±5,6	38,3±3,0	38,3±5,4	35,0±5,6	35,5±3,4	31,7±3,0	0,0
PK	13,3±2,1**	15,0±2,2**	16,7±3,3**	19,7±4,8**	17,0±3,4**	20,0±0,0**	18,3±4,7**	48,3
Ro5	14,6±3,3**	14,0±0,0**	18,3±3,0**	16,0±2,2**	17,0±2,2**	18,3±1,7**	18,3±3,3**	50,1

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 10** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de substância P (10 nmol/pata). Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 a 11 animais). Difere significativamente do grupo controle (substância p) \*p<0,05 ou \*\*p<0,01.

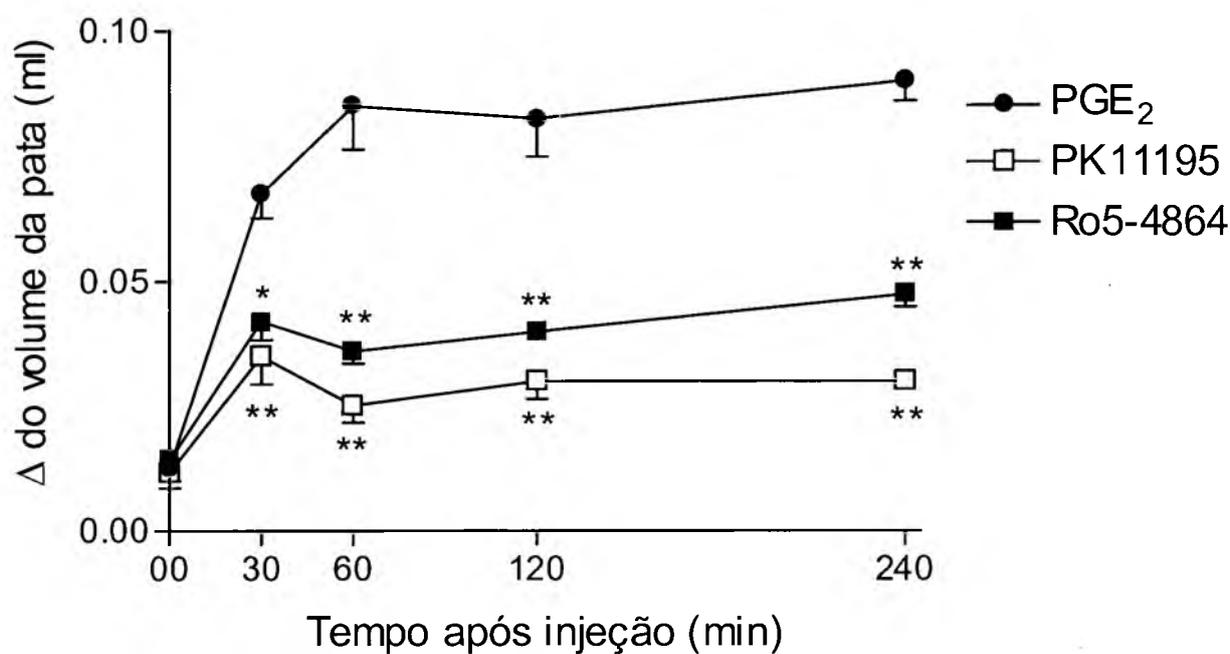
**Tabela 8** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de substância P (10 nmol/pata).

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata induzido por substância P (10 <sup>-3</sup> ml)					<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	
Substância P	68,6±7,0	58,6±5,0	57,1±5,2	48,6±4,0	30,0±3,8	0,0
PK 11195	47,1±4,2**	30,0±2,1**	24,2±2,0**	23,7±3,2**	17,5±3,6*	46,3
Ro5-4865	42,2±4,3**	33,3±3,3**	25,6±1,7**	23,3±3,7**	16,6±2,9*	46,6

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \* p<0,05 ou \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 11** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) (30 nmol/pata). Os símbolos e barras verticais representam as médias ± E.P.M. de (6 a 11 animais). Difere significativamente do grupo controle (PGE<sub>2</sub>) \* p<0,05 ou \*\* p<0,01.

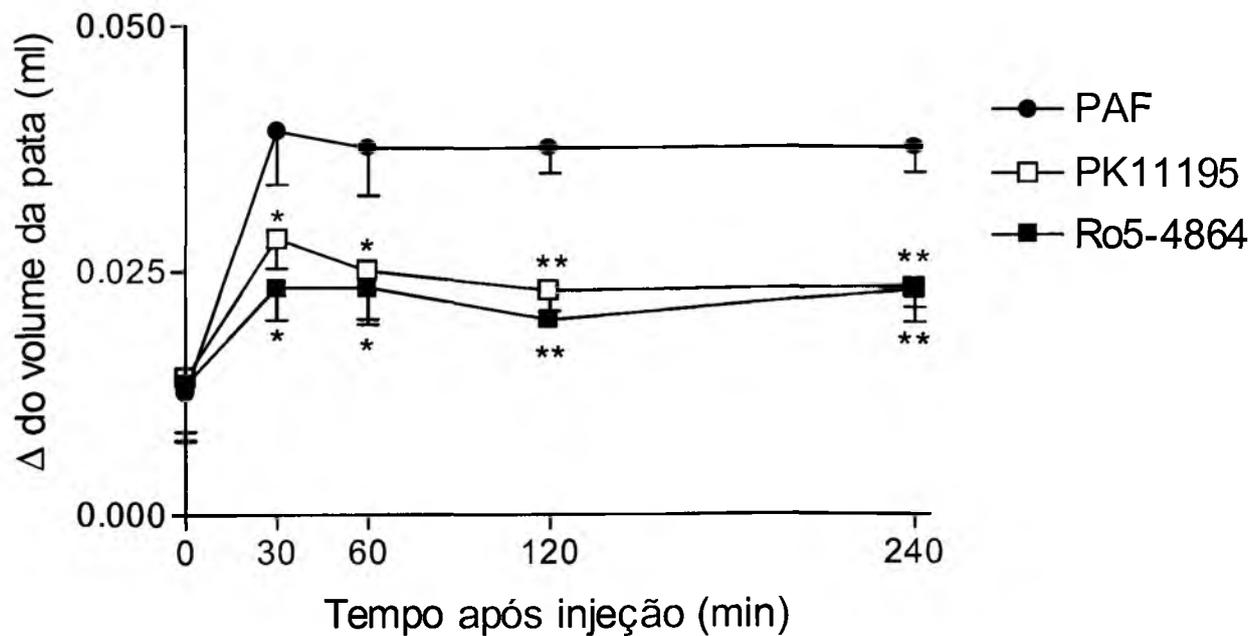
**Tabela 9** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de prostaglandina E<sub>2</sub> (30 nmol/pata) em camundongos.

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata induzido por prostaglandina E <sub>2</sub> (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
PGE <sub>2</sub>	67,5±4,8	85,5±8,6	82,5±7,5	90,0±4,0	0,0
PK11195	35,0±5,6 **	25,0±3,4 **	30,0±3,6 **	30,0±0,0 **	63,7
Ro5-4864	42,0±3,7 *	36,0±2,4 **	40,0±0,0 **	47,5±2,5 **	49,4

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle (PGE<sub>2</sub>) \*\*p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 12** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de PAF-acéter (PAF) (10 nmol/pata). Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 a 11 animais). Difere significativamente do grupo controle (PAF) \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,01$ .

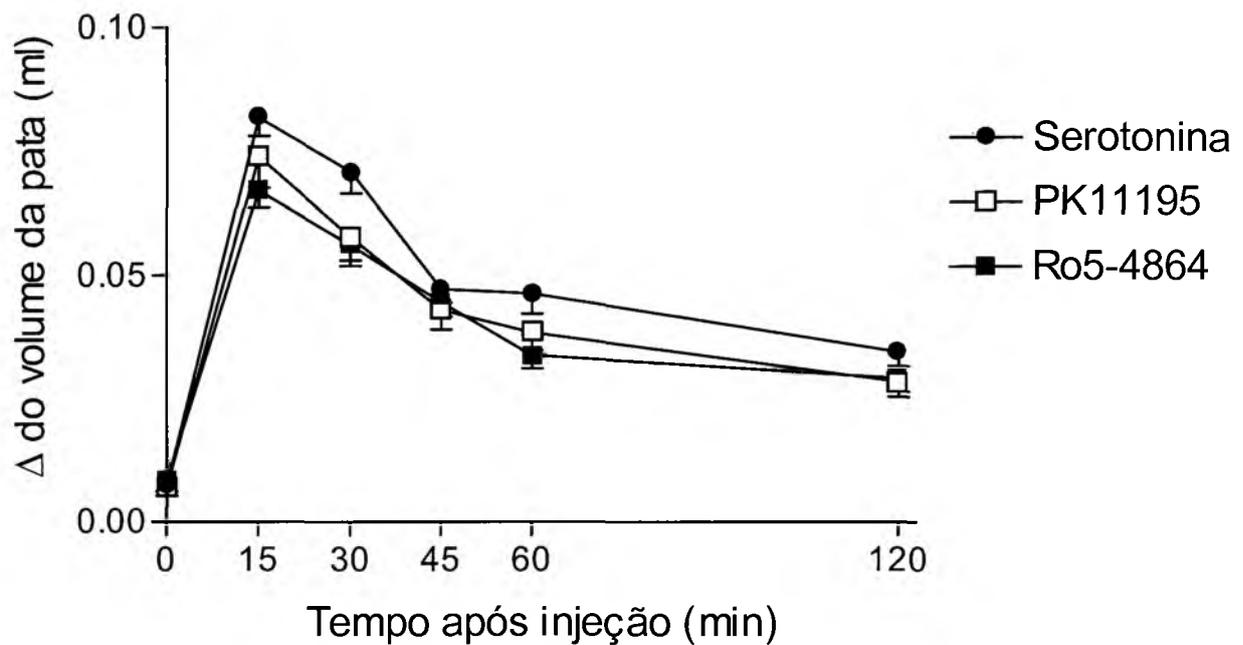
**Tabela 10** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de PAF-acéter (PAF 10 nmol/pata) em camundongos.

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata induzido pelo PAF ( $10^{-3}$ ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
PAF	39,2±5,3	37,5±4,8	37,5±2,5	37,5±2,5	0,0
PK11195	28,3±3,0 *	25,0±5,5 *	23,0±2,1 **	23,3±2,1 **	34,9
Ro5-4864	23,3±3,3 *	23,3±3,3 *	20,0±0,0 **	23,0±3,3 **	40,9

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 11 animais.

Difere significativamente em relação ao controle \*  $p < 0,05$  ou \*\*  $p < 0,01$ .

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.

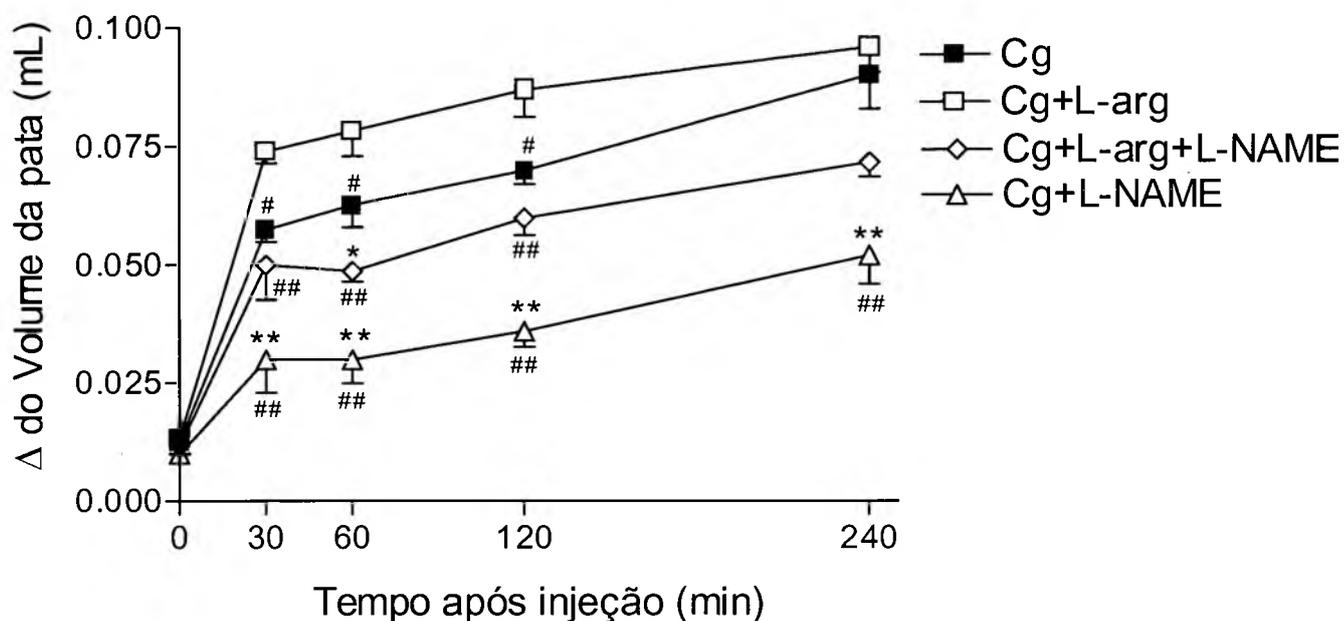


**Figura 13** - Efeito antiedematogênico do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da injeção intraplantar de serotonina (10 nmol/pata). Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 a 11 animais). Não difere significativamente do grupo controle (serotonina).

#### 4.5 . AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO PELO PK11195 E Ro5-4864 SOBRE A AÇÃO EDEMATOGÊNICA DO ÓXIDO NÍTRICO NO MODELO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS

O edema de pata induzido pela co-injeção intraplantar de Cg (300 µg/pata) e L-arginina (15 µmol/pata) promoveu o aumento deste edema em 16% quando comparado com edema de pata induzido somente pela carragenina  $p < 0,05$  (Figura 14 e Tabela 11). A co-injeção da Cg (300 µg/pata) e L-NAME (15 µmol/pata) inibiu significativamente em 47% o edema induzido por este agente flogístico. No entanto nos animais que receberam Cg (300 µg/pata) + L-arginina (15 µmol/pata) + L-NAME (15 µmol/pata) o percentual de inibição foi de somente 17,5% no (Figura 14 e tabela 11).

O PK11195 inibiu a ação edematogênica da L-arginina (15 µmol/pata) co-injetada com a Cg em 46% na mesma proporção em que o PK11195 inibiu o edema induzido somente pela Cg em 41% (Figura 15 A e tabela 12). Da mesma forma ocorreu com Ro5-4864, em que a ação edematogênica da L-arginina (15 µmol/pata) co-injetada com Cg foi inibida em 45% por este ligante do PBR. A inibição do edema induzida somente pela Cg foi também inibida na mesma magnitude pelo Ro5-4864 em 45% (Figura 15 B e tabela 12).



**Figura 14** - Efeito da co-injeção intraplantar de L-arginina (L-arg) (15  $\mu\text{mol/pata}$ ) e L-NAME (15  $\mu\text{mol/pata}$ ) e L-arg + L-NAME sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu\text{g/pata}$ ) em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (4 a 6 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg + L-arginina # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$ .

**Tabela 11-** Efeito da co-injeção intraplantar de L-arginina (L-arg) (15  $\mu\text{mol/pata}$ ) e L-NAME (15  $\mu\text{mol/pata}$ ) e L-arg + L-NAME sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300  $\mu\text{g/pata}$ ) em camundongos.

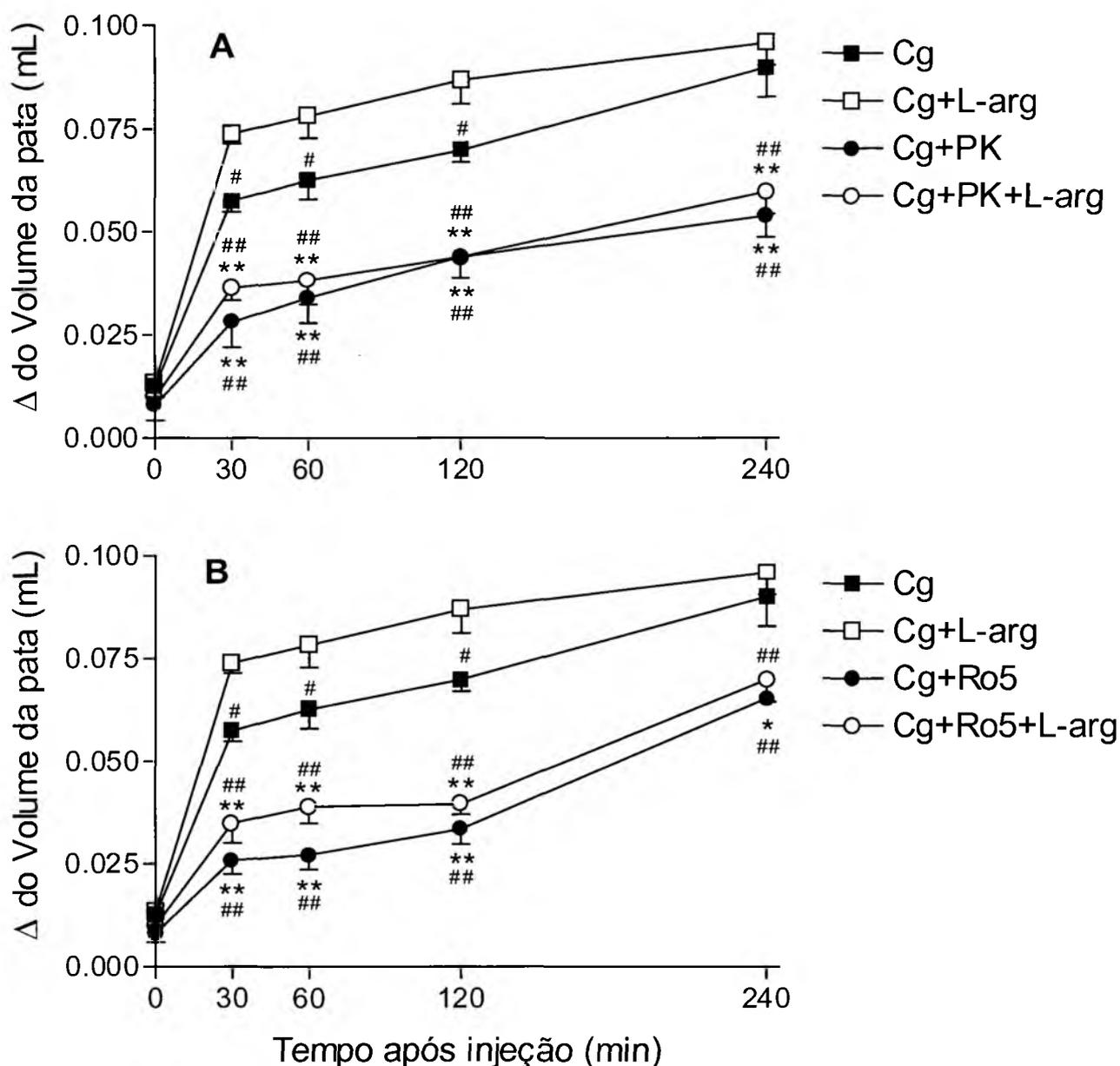
Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata ( $10^{-3}$ ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>57,5<math>\pm</math>1,4</b>	<b>62,7<math>\pm</math>2,2</b>	<b>70,0<math>\pm</math>2,8</b>	<b>90,0<math>\pm</math>8,1</b>	<b>0,0</b>
Cg+ L-arg+ L-NAME	50,0 $\pm$ 7,3	48,6 $\pm$ 2,1 *	60,0 $\pm$ 3,6	71,0 $\pm$ 3,0	17,5
Cg + L-NAME	17,0 $\pm$ 2,4 **	16,6 $\pm$ 3,3 **	18,0 $\pm$ 1,0 **	20,0 $\pm$ 1,0 **	46,7
<b>Cg + L-arg</b>	<b>74,0<math>\pm</math>2,1</b>	<b>78,3<math>\pm</math>4,3</b>	<b>87,5<math>\pm</math>4,7</b>	<b>96,0<math>\pm</math>7,3</b>	<b>0,0</b>
Cg	57,5 $\pm$ 1,4 #	62,7 $\pm$ 2,2 #	70,0 $\pm$ 2,8 #	90,0 $\pm$ 8,1	15,8
Cg+ L-arg+ L-NAME	50,0 $\pm$ 7,3 ###	48,6 $\pm$ 2,1 ###	60,0 $\pm$ 3,6 ###	71,0 $\pm$ 3,0 ##	30,5
Cg + L-NAME	17,0 $\pm$ 2,4 ###	16,6 $\pm$ 3,3 ###	18,0 $\pm$ 1,0 ###	20,0 $\pm$ 1,0 ###	55,1

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle **Cg** \*  $p < 0,05$  ou \*\*  $p < 0,01$ .

Difere significativamente em relação ao controle **Cg + L-arginina** #  $p < 0,05$ ###  $p < 0,01$ .

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob curva.



**Figura 15** - Efeito antiedematogênico de PK11195 (PK) (A) e Ro5-4864 (Ro5) (B) na dose de 0,1mg/kg, via i.p., administrado 24h antes da co-injeção intraplantar de L-arginina (L-arg) (15  $\mu$ mol/pata) e carragenina (300  $\mu$ g/pata) sobre o edema de pata em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (4 a 6 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg + L-arginina #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$ .

**Tabela 12** - Efeito antiedematogênico de PK11195 (PK) e Ro5-4864 (Ro5) na dose de 0,1mg/kg, via i.p., administrado 24h antes da co-injeção intraplantar de L-arginina (L-arg) (15  $\mu$ mol/pata) e carragenina (300  $\mu$ g/pata) sobre o edema de pata em camundongos.

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata ( $10^{-3}$ ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>57,5<math>\pm</math>1,4</b>	<b>62,7<math>\pm</math>2,2</b>	<b>70,0<math>\pm</math>2,8</b>	<b>90,0<math>\pm</math>8,1</b>	<b>0,0</b>
PK+ L-arg + Cg	36,0 $\pm$ 3,0 *	38,0 $\pm$ 6,0 **	44,0 $\pm$ 5,0 **	60,0 $\pm$ 5,0 **	35,9
PK + Cg	28,0 $\pm$ 6,0 **	34,0 $\pm$ 6,0 **	44,0 $\pm$ 1,0 **	54,0 $\pm$ 5,0 **	41,0
Ro5 + L-arg + Cg	35,0 $\pm$ 5,0 *	39,0 $\pm$ 4,0 **	40,0 $\pm$ 2,0 **	70,0 $\pm$ 5,0	34,8
Ro5+Cg	26,0 $\pm$ 3,0 **	27,0 $\pm$ 4,0 **	34,4 $\pm$ 4,0 **	65,0 $\pm$ 2,0 *	44,8
<b>Cg + L-arg</b>	<b>74,0<math>\pm</math>2,1</b>	<b>78,3<math>\pm</math>4,3</b>	<b>87,5<math>\pm</math>4,7</b>	<b>96,0<math>\pm</math>7,3</b>	<b>0,0</b>
PK+ L-arg + Cg	36,0 $\pm$ 3,0 ##	38,0 $\pm$ 6,0 ##	44,0 $\pm$ 5,0 ##	60,0 $\pm$ 5,0 ##	46,1
PK + Cg	28,0 $\pm$ 6,0 ##	34,0 $\pm$ 6,0 ##	44,0 $\pm$ 1,0 ##	54,0 $\pm$ 5,0 ##	50,4
Ro5 + L-arg + Cg	35,0 $\pm$ 5,0 ##	39,0 $\pm$ 4,0 ##	40,0 $\pm$ 2,0 ##	70,0 $\pm$ 5,0 ##	45,1
Ro5+Cg	26,0 $\pm$ 3,0 ##	27,0 $\pm$ 4,0 ##	34,4 $\pm$ 4,0 ##	65,0 $\pm$ 2,0 ##	53,8

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 a 6 animais.

Difere significativamente do grupo controle com Cg \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle com Cg+ L-arginina # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$ .

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob curva.

#### 4.6. PARTICIPAÇÃO DA INTERLEUCINA-13 (IL-13) NA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO PK11195 E Ro5-4864 NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A injeção intraplantar de IL-13 (1 pmol/pata), 5 minutos antes da injeção de carragenina, produziu uma inibição significativa do edema de pata (% de inibição) de 37%, sendo que aos 240 min foi obtida uma resposta de inibição máxima de  $68,0 \pm 2,8 \times 10^{-3}$  ml, enquanto que para o grupo controle foi de  $105,7 \pm 2,4 \times 10^{-3}$  ml ( $p < 0,01$ ) (Figura 16 A e B, Tabela 13).

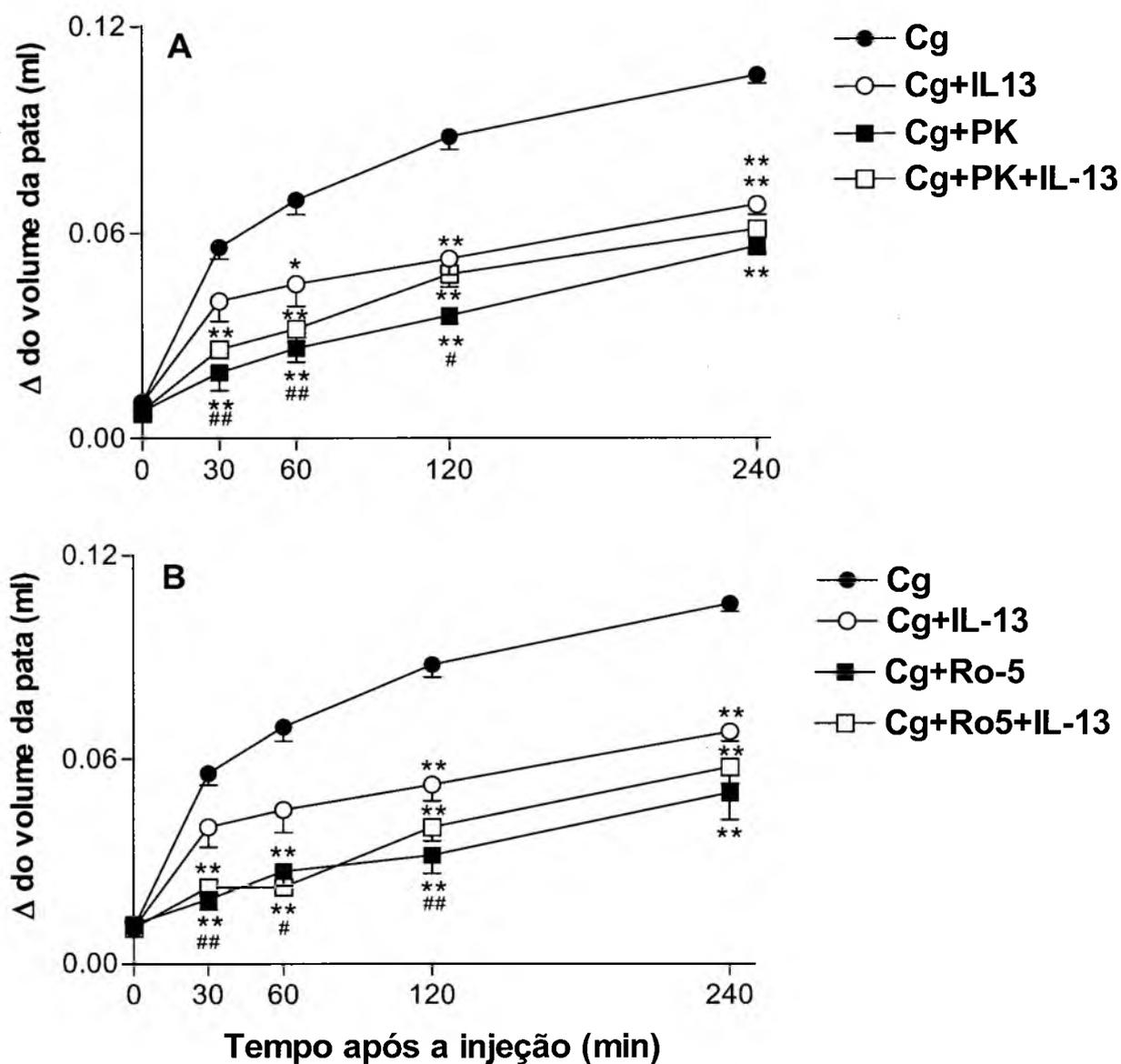
A atividade antiedematogênica do PK11195 e do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 horas antes do experimento, não foi alterada significativamente pela injeção intraplantar de IL-13 (1 pmol/pata), 5 minutos antes da aplicação de carragenina (300  $\mu$ g/pata) ( $p > 0,05$ ) (Figura 16 A e B, Tabela 13). Na presença de IL-13 nas doses de 10 e 100 pmol/pata diminuiu o efeito antiedematogênico do PK11195 em 28% e 26% respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Figuras 17 e 18; Tabelas 14 e 15). O efeito antiedematogênico do Ro5-4864 foi diminuído em 26% e 20% na presença de 10 e 100 pmol/pata de IL-13 respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figuras 17 e 18; Tabelas 14 e 15).

A injeção intraplantar simultânea de IL-13 (10 pmol/pata) com carragenina produziu diminuído edema de pata induzido pela Cg significativa (% de inibição) 36% ( $p < 0,05$ ) (Figura 19 A e B. Tabela 16). A injeção simultânea da IL-13 (10 pmol/pata) com a carragenina (300  $\mu$ g/pata), não foi capaz de interferir na atividade antiedematogênica do PK11195 ou do Ro5-4864 quando os mesmos foram

administrados 24 h antes da injeção da IL-13 ao mesmo tempo da carragenina.( $p>0,05$ ) (Figura 19 A e B e Tabela 16).

Quando este mesmo procedimento foi feito injetando IL-13 (10 pmol/pata), 10 min antes da injeção intraplantar de carragenina, a IL-13 não interferiu na atividade edematogênica da carragenina e nem na atividade antiedematogênica do PK11195 e Ro5-4864 ( $p>0,05$ ) (Figura 20 A e B e Tabela 17).

A injeção intraplantar de IL-13 por si só, não promoveu um aumento no edema de pata (dados não mostrados).



**Figura 16** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (1 pmol/pata), 5 min antes do edema de pata induzido pela aplicação de 300  $\mu$ g de carragenina (Cg) na pata. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg + IL-13 #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$ .

**Tabela 13** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) e Ro5-4864 (Ro5) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (1 pmol/pata). IL-13 foi administrada 5 min antes da carragenina (Cg, 300 µg/pata ).

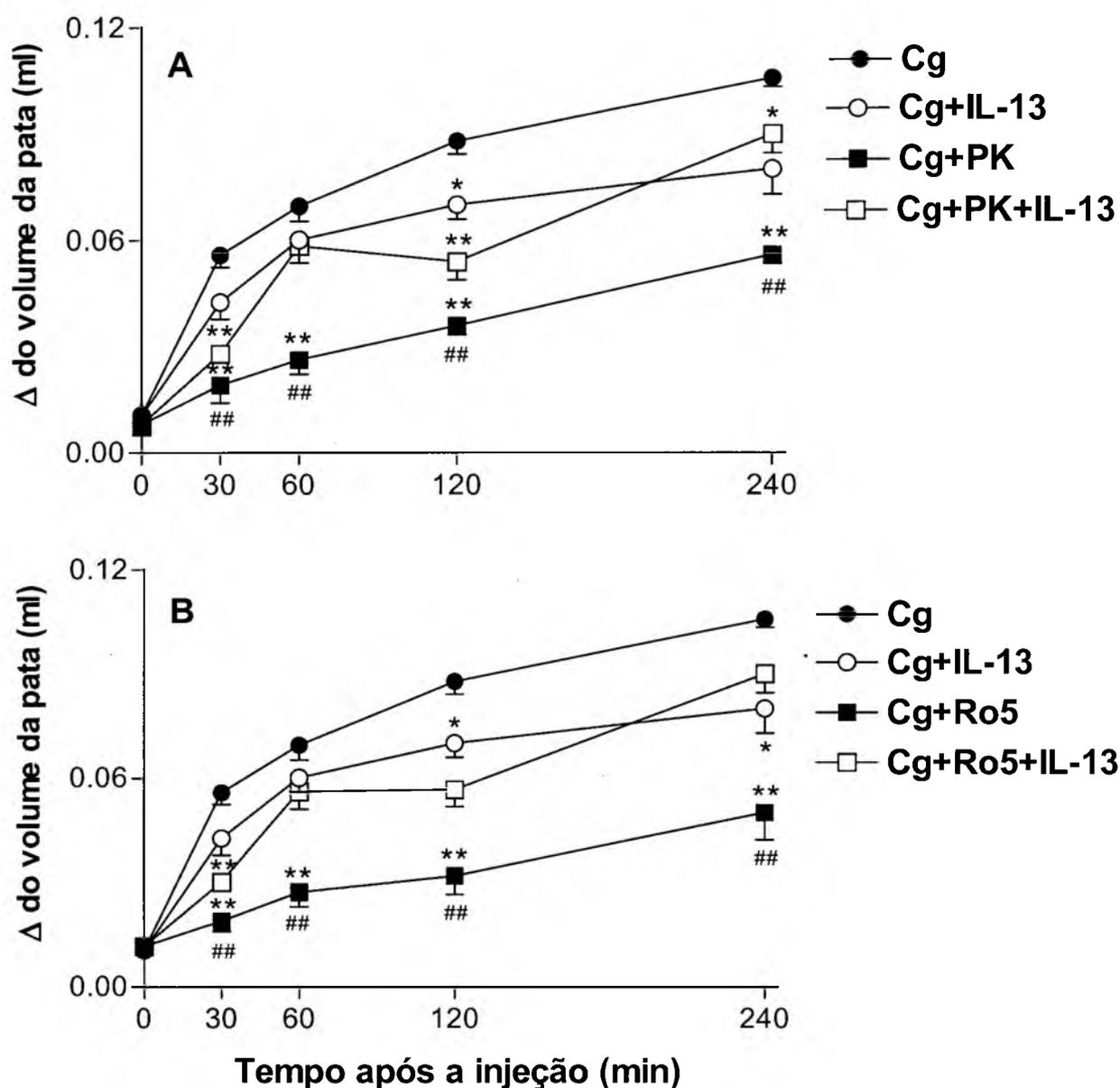
Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>55,7±3,1</b>	<b>69,4±4,2</b>	<b>87,8±3,7</b>	<b>105,7±2,4</b>	<b>0,0</b>
Cg+IL-13	40,0±4,9	45,0±5,8	52,5±4,7 **	68,0±2,8 **	36,6
Cg+PK	19,2±5,0 **	26,3±4,0 **	36,0±2,0 **	56,0±2,5 **	55,9
Cg+PK+IL-13	26,0±2,4 **	32,0±3,7 **	48,0±3,7 **	61,0±6,6 **	46,3
Cg+Ro5	18,8±2,9 **	27,1±4,1 **	31,8±5,3 **	50,0±7,8 **	59,1
Cg+Ro5+IL-13	22,5±2,5 **	22,5±2,5 **	40,0±4,1 **	57,0±4,7 **	53,3
<b>Cg+IL-13</b>	<b>40,0±4,9</b>	<b>45,0±5,8</b>	<b>52,5±4,7</b>	<b>68,0±2,8</b>	<b>0,0</b>
Cg+PK	19,2±5,0 ##	26,3±4,0	36,0±2,0 #	56,0±2,5	30,4
Cg+PK+IL-13	26,0±2,4	32,0±3,7	48,0±3,7	61,0±6,6	15,3
Cg+Ro5	18,8±2,9 ##	27,1±4,1 #	31,8±5,3 ##	50,0±7,8	35,4
Cg+Ro5+IL-13	22,5±2,5	22,5±2,5 #	40,0±4,1	57,0±4,7	26,3

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle **Cg** \*\*p<0,01.

Difere significativamente em relação ao controle **Cg + IL-13** #p<0,05 e ##p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 17** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata), 5 min antes do edema de pata induzido pela aplicação de 300  $\mu$ g de carragenina (Cg) na pata. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg+ IL-13  $^{##}p < 0.01$

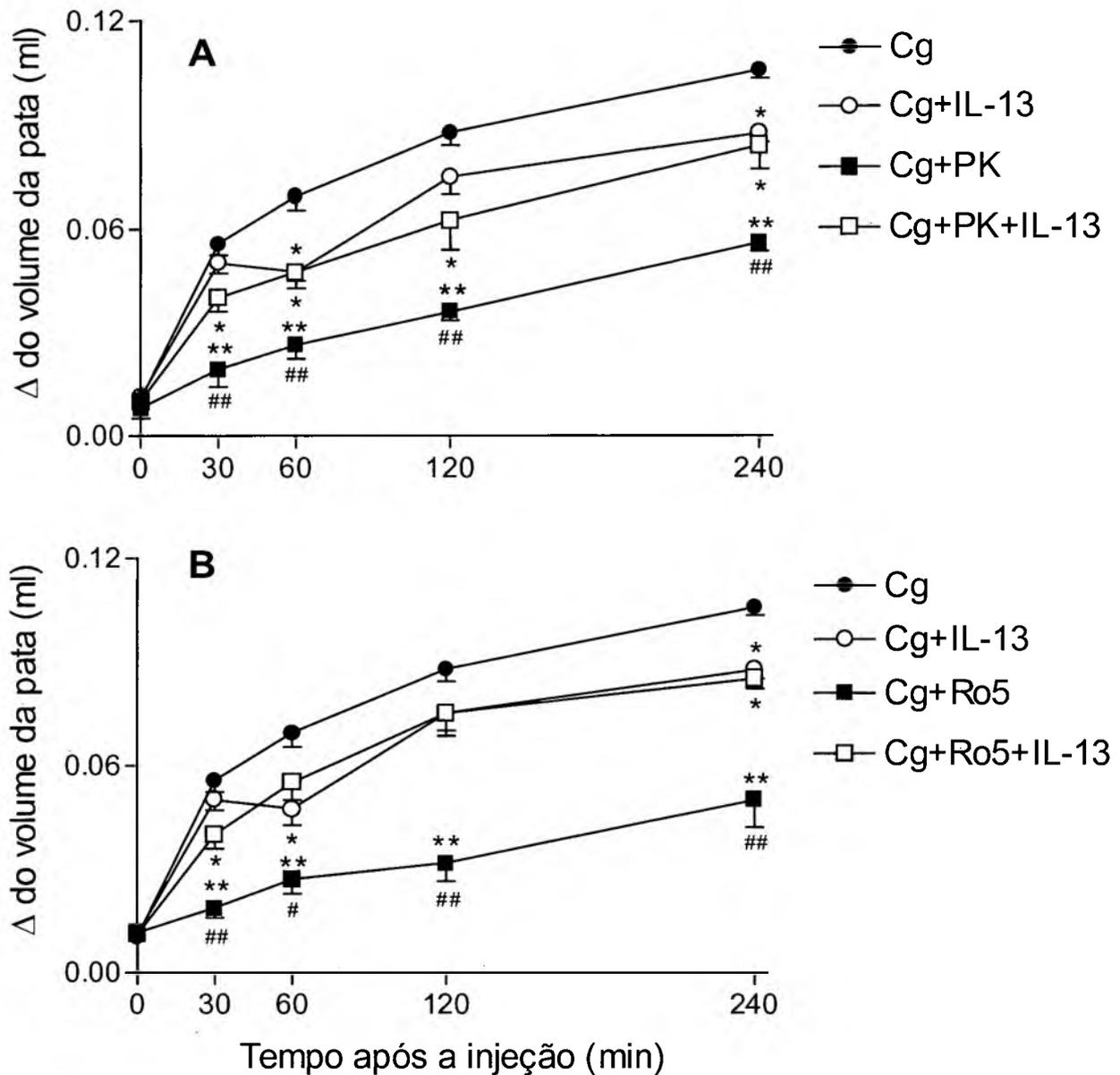
**Tabela 14** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) e Ro5-4864 (Ro5) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata). IL-13 foi administrado 5 min antes da carragenina ( Cg, 300 µg/pata).

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>56,2±3,4</b>	<b>68,9±4,2</b>	<b>88,7±3,7</b>	<b>104,0±2,3</b>	<b>0,0</b>
Cg+IL13	42,5±4,7	60,0±4,0	70,0±4,0 *	80,0±7,0 *	20,7
Cg+PK	19,2±5,0 **	26,3±4,0 **	36,0±2,5 **	56,0±2,5 **	55,8
Cg+PK+IL-13	28,0±2,0 **	58,3±4,7	54,0±5,0 *	90,0±5,4	27,9
Cg+Ro5	18,8±2,3 **	27,1±4,2 **	31,8±5,3 **	50,0±7,8 **	59,3
Cg+Ro5+IL-13	30,0±2,0 **	56,0±5,0	56,6±4,9 **	90,0±5,4	26,6
<b>Cg+IL13</b>	<b>42,5±4,7</b>	<b>60,0±4,0</b>	<b>70,0±4,0</b>	<b>80,0±7,0</b>	<b>0,0</b>
Cg+PK	19,2±5,0 ##	26,3±4,0 ##	36,0±2,5 ##	56,0±2,5 #	43,8
Cg+PK+IL-13	28,0±2,0	58,3±4,7	54,0±5,0	90,0±5,4	8,7
Cg+Ro5	18,8±2,3 ##	27,1±4,2 ##	31,8±5,3 ##	50,0±7,8 ##	48,6
Cg+Ro5+IL-13	30,0±2,0	56,0±5,0	56,6±4,9	90,0±5,4	7,5

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle Cg \*<0,05 \*\*p<0,01 e do grupo controle Cg+ IL-13 #< 0,05 ##p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 18** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (100 pmol/pata), 5 min antes do edema de pata induzido pela aplicação de 300  $\mu$ g de carragenina na pata. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 a 10 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg + IL-13. # $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$ .

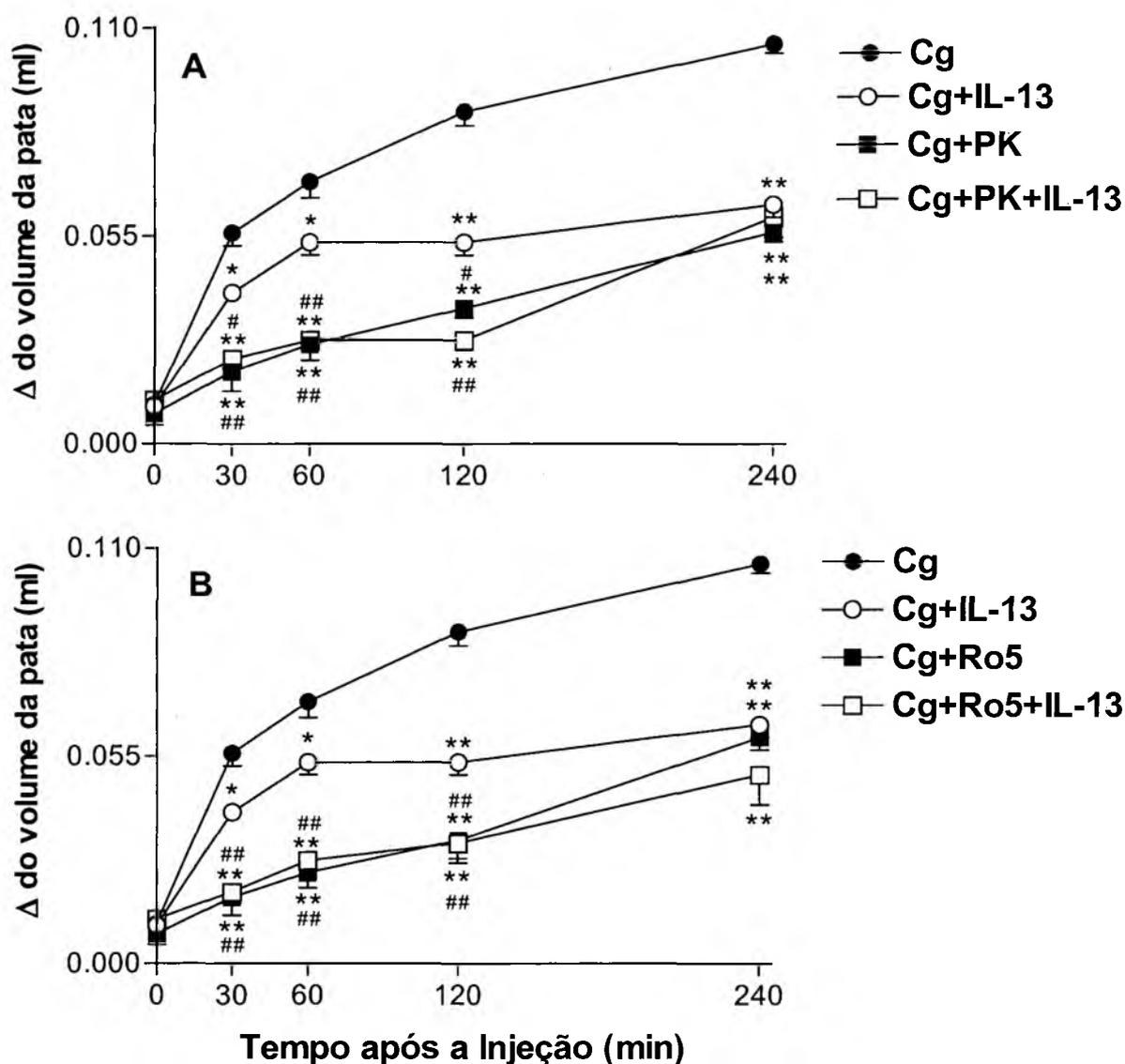
**Tabela 15** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) e Ro5-4864 (Ro5) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (100 pmol/pata). IL-13 foi injetada 5 min antes da carragenina (Cg, 300 µg).

Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>56,7±3,4</b>	<b>68,9±4,1</b>	<b>88,7±3,6</b>	<b>103,5±3,6</b>	<b>0,0</b>
Cg+IL-13	50,0±2,8	47,5±4,7 *	72,0±5,0	83,5±2,5 *	20,1
Cg+PK	19,2±5,0 **	26,3±4,0 **	36,0±2,5 **	56,0±2,5 **	55,8
Cg+PK+IL-13	40,0±4,0 *	47,5±2,5 *	62,5±8,5 *	84,0±5,4 *	26,4
Cg+Ro5	18,8±2,3 **	27,1±4,2 **	31,8±5,3 **	50,0±7,8 **	59,3
Cg+Ro5+IL-13	40,0±4,0 *	55,0±5,0	75,0±6,4	84,0±2,8 *	20,1
<b>Cg+IL-13</b>	<b>50,0±2,8</b>	<b>47,5±4,7</b>	<b>72,0±5,0</b>	<b>83,5±2,5</b>	<b>0,0</b>
Cg+PK	19,2±5,0 ###	26,3±4,0 #	36,0±2,5 ###	56,0±2,5 ###	44,8
Cg+PK+IL-13	40,0±4,0	47,5±2,5	62,5±8,5	84,0±5,4	9,8
Cg+Ro5	18,8±2,3 ###	27,1±4,2 #	31,8±5,3 ###	50,0±7,8 ###	49,0
Cg+Ro5+IL-13	40,0±4,0	55,0±5,0	75,0±6,4	84,0±2,8	2,2

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com Cg \*p< 0,05 \*\*p<0,01 e do grupo controle tratado com Cg + IL-13 #p< 0,05 ###p<0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 19** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar simultânea de IL-13 (10 pmol/pata) e carragenina (Cg) (300 μg/pata) no edema de pata. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg+ IL-13 # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$ .

**Tabela 16** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) (A) e Ro5-4864 (Ro5) (B) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar simultânea de IL-13 (10 pmol/pata) e carragenina (Cg, 300 µg/pata).

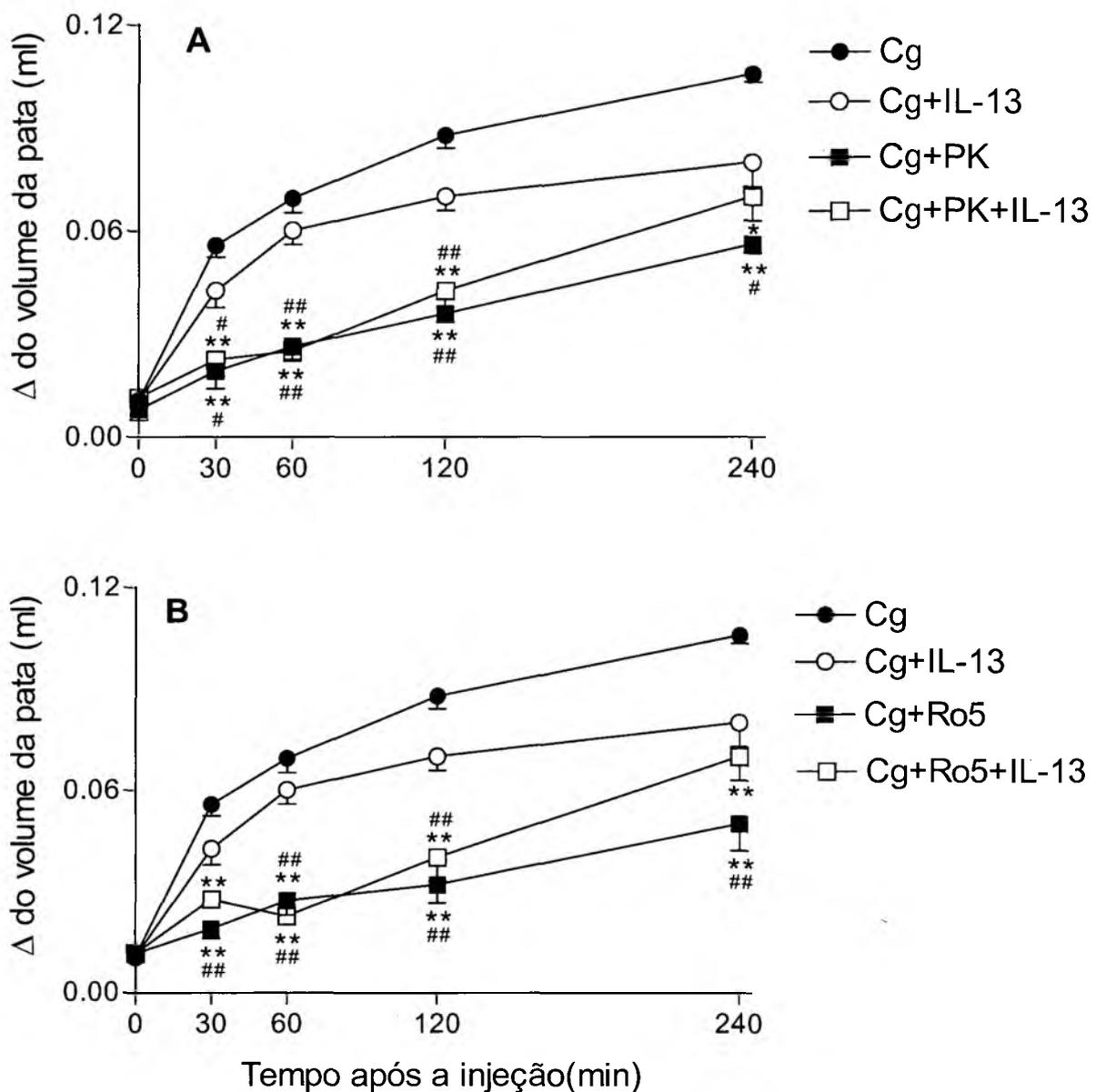
Grupos	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>54,8±3,1</b>	<b>69,8±4,1</b>	<b>88,7±3,5</b>	<b>104,7±2,3</b>	<b>0,0</b>
Cg+IL13	40,0±0,0 *	53,3±3,0 *	53,3±3,0 **	63,3±3,3 **	35,7
Cg+PK	19,2±5,0 **	26,3±4,0 **	36,0±2,5 **	56,0±2,5 **	55,8
Cg+PK+IL-13	22,5±2,5 **	27,5±2,5 **	26,9±2,5 **	60,0±5,4 **	57,8
Cg+Ro5	18,8±2,3 **	27,1±4,2 **	31,8±5,3 **	50,0±7,8 **	59,3
Cg+Ro5+IL-13	17,5±4,7 **	24,5±4,0 **	32,5±4,7 **	60,0±3,2 **	57,1
<b>Cg+IL13</b>	<b>40,0±0,0</b>	<b>53,3±3,0</b>	<b>53,3±3,0</b>	<b>63,3±3,3</b>	<b>0,0</b>
Cg+PK	19,2±5,0 ##	26,3±4,0 ##	36,0±2,5 #	56,0±2,5	31,3
Cg+PK+IL-13	22,5±2,5 #	27,5±2,5 ##	26,9±2,5 ##	60,0±5,4	34,2
Cg+Ro5	18,8±2,3 ##	27,1±4,2 ##	31,8±5,3 ##	50,0±7,8	36,0
Cg+Ro5+IL-13	17,5±4,7 ##	24,5±4,0 ##	32,5±4,7 ##	60,0±3,2	32,1

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com Cg \*p< 0,05 \*\* p<0,01.

e do grupo controle tratado com Cg + IL-13 #p< 0,05 ##p< 0,01.

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.



**Figura 20** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (A) e Ro5-4864 (B) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata), 10 min antes da injeção de 300 µg de carragenina (Cg) na pata. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M. de (6 animais). Difere significativamente do grupo controle tratado com Cg \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com Cg+ IL-13 # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$ .

**Tabela 17** - Efeito antiedematogênico do PK11195 (PK) e Ro5-4864 (Ro5) (0,1 mg/kg; i.p.), administrados 24 h antes da injeção intraplantar de IL-13 (10 pmol/pata). IL-13 foi administrada 10 min antes da carragenina (Cg, 300 µg/pata).

Grupo	<sup>1</sup> Edema de pata (10 <sup>-3</sup> ml)				<sup>2</sup> inibição do edema (%)
	30 min	60 min	120 min	240 min	
<b>Cg</b>	<b>55,1±3,3</b>	<b>69,6±3,9</b>	<b>87,6±3,5</b>	<b>102,5±2,3</b>	<b>0,0</b>
Cg+IL13	42,5±4,7	60,0±4,0	75,0±4,1	89,5±7,0	20,7
Cg+PK	19,2±5,0 **	26,3±4,0 **	36,0±2,5 **	56,0±2,5 **	55,9
Cg+PK+IL-13	22,5±4,7 **	25,0±2,8 **	42,5±4,7 **	61,0±7,1 *	47,9
Cg+Ro5	18,8±2,3 **	27,1±4,2 **	31,8±5,3 **	50,0±7,8 **	59,3
Cg+Ro5+IL-13	28,5±2,5 **	22,5±2,5 **	40,0±4,8 **	70,0±7,1 **	48,9
<b>Cg+IL13</b>	<b>42,5±4,7</b>	<b>60,0±4,0</b>	<b>75,0±4,1</b>	<b>89,5±7,0</b>	<b>0,0</b>
Cg+PK	19,2±5,0 #	26,3±4,0 ###	36,0±2,5 ##	56,0±2,5 #	44,3
Cg+PK+IL-13	22,5±4,7 #	25,0±2,8 ###	42,5±4,7 ##	61,0±7,1	34,3
Cg+Ro5	18,8±2,3 ###	27,1±4,2 ###	31,8±5,3 ##	50,0±7,8 ###	48,6
Cg+Ro5+IL-13	28,5±2,5	22,5±2,5 ###	40,0±4,8 ##	70,0±7,1	35,5

<sup>1</sup> Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com **Cg** \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e do grupo controle tratado com **Cg+IL-13** # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$ .

<sup>2</sup> A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva.

#### 4.7 . EFEITO DO PK11195 E DO Ro5-4864 NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA (4h) EM CAMUNDONGOS

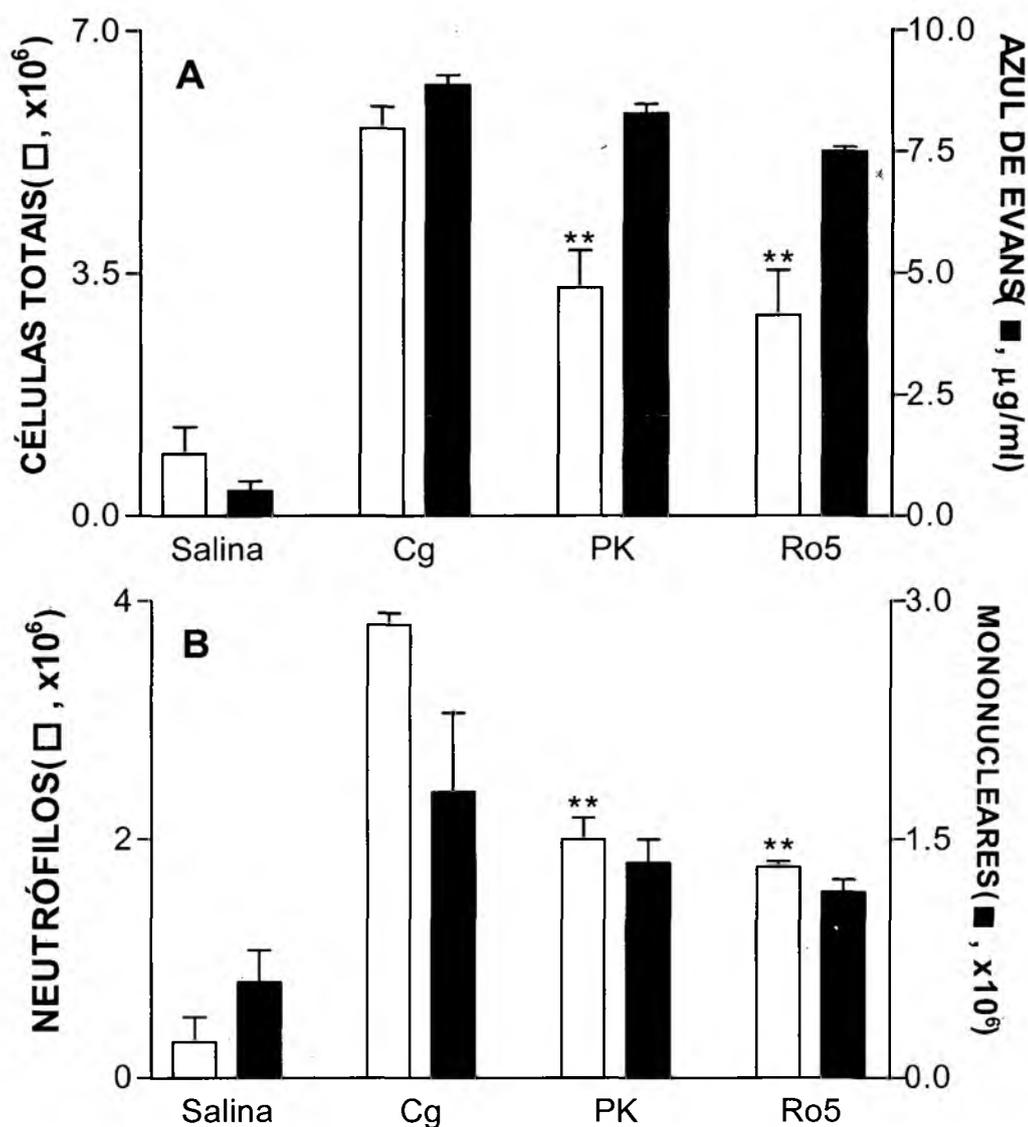
A injeção de carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos na primeira fase do processo inflamatório (4 h) promove aumento tanto do extravasamento plasmático de  $8,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$  e o aumento da migração celular foi de  $4,5 \pm 0,3 \times 10^6$ . Os animais-controle (tratados com solução tampão PBS) os valores das concentrações de azul de Evans foram de:  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$  e migração celular de  $0,7 \pm 0,1 \times 10^6$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 21 e Tabela 18).

Os animais tratados previamente com PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg) administrado via intraperitoneal (i.p.) 1h e 12h antes da injeção do agente flogístico promoveu uma inibição significativa do influxo celular de leucócitos para a cavidade pleural, representado principalmente por neutrófilos quando comparados com o grupo controle, sendo que para o PK11195 foi respectivamente de  $34 \pm 3\%$  e  $50 \pm 2\%$  e para o Ro5-4864 foi respectivamente de  $43 \pm 4\%$  e  $45 \pm 1\%$ . (Figuras 21 e 22; Tabelas 18 e 19).

Os resultados apresentados na Figura 23 e tabela 20 demonstram que o tratamento prévio com PK11195 e do Ro5-4864 0,1 mg/kg por via i.p. 24h antes da aplicação do agente flogístico, inibiu de maneira significativa à migração celular principalmente de neutrófilos, para o PK11195 a inibição foi de  $64 \pm 4\%$  e para o Ro5-4864 foi de  $53 \pm 3\%$ .

Os ligantes do receptor PBR, PK11195 e Ro5-4864, administrado 1 h, 12 h e 24 h não foram efetivos em inibir o extravasamento plasmático induzido pela carragenina na cavidade pleural. (Figuras 21, 22 e 23; Tabela 18, 19 e 20).

A dose de 0,01 mg/kg de PK11195 e Ro5-4864 24 h antes do agente flogístico, não foi efetiva em inibir a migração celular e a exsudação neste, (Figura 24; Tabela 21).



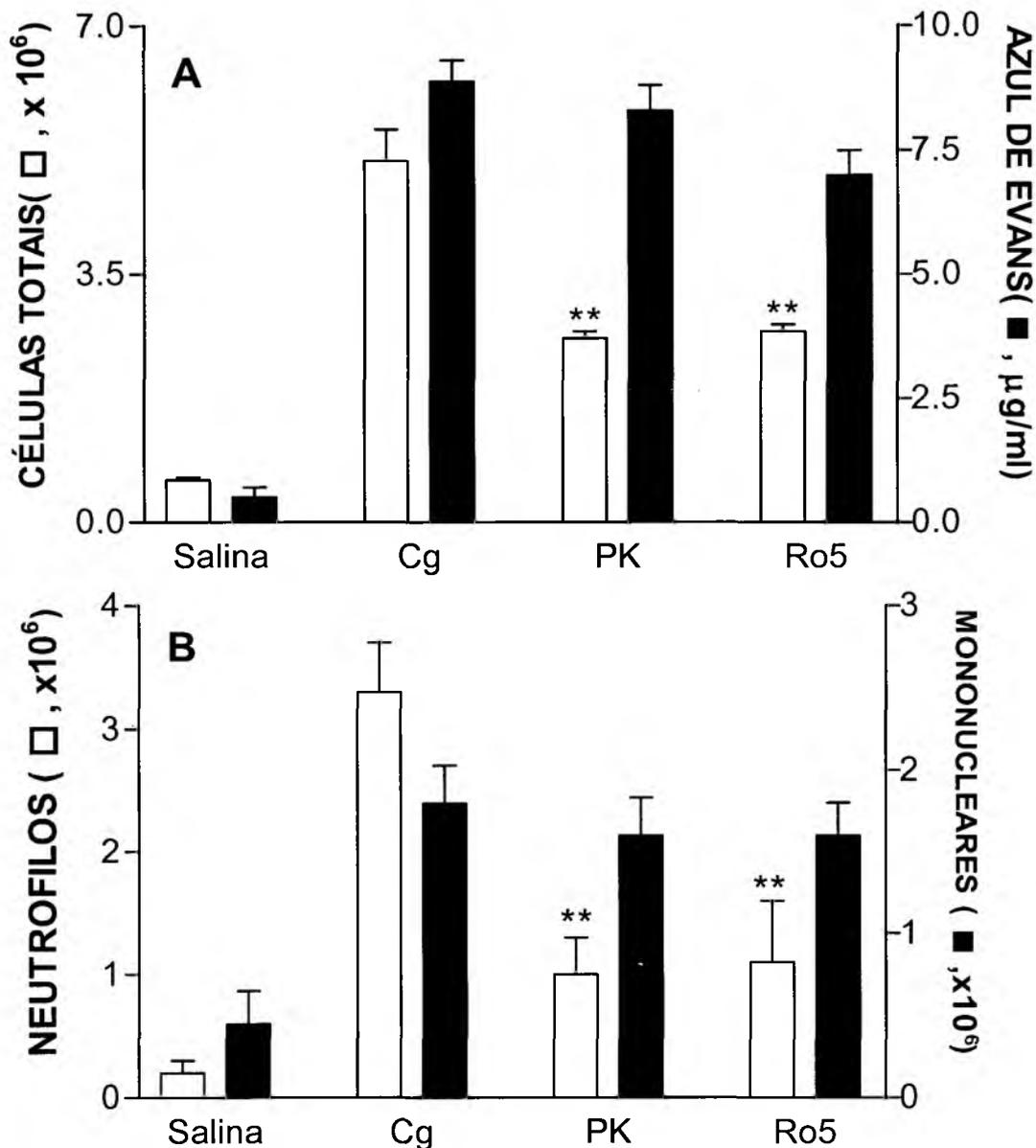
**Figura 21** - Efeito do PK11195 (PK) e do Ro5-4864 (Ro5) (0,1mg/kg; i.p.) administrados 1 h antes da Cg sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina 1%/cav em camundongos. **A** – (Cg) representa animais do grupo controle tratados com carragenina e (salina) representa o grupo controle tratado com salina, ambos via intratorácica (i.t.). As colunas abertas representam as células totais (x 10<sup>6</sup>) e as colunas fechadas representam a exsudação (μg/ml). **B** - as colunas fechadas indicam os mononucleares (x 10<sup>6</sup>) e as colunas abertas indicam os neutrófilos (x 10<sup>6</sup>). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 6 animais, e as barras verticais, o E.P.M. Os asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Cg) \*\* p<0,01.

**Tabela 18** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 1 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%/cav, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).

Grupos	Dose (mg/kg)	Células Totais ( $\times 10^6$ )	Neutrófilos ( $\times 10^6$ )	Mononucleares ( $\times 10^6$ )	Exsudato ( $\mu\text{g/ml}$ )
Salina	-	0,9 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
Carragenina	-	5,6 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,05	8,9 $\pm$ 0,2
PK11195	0,1	3,3 $\pm$ 0,5**	2,0 $\pm$ 0,2**	1,3 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,2
Ro5-4864	0,1	2,9 $\pm$ 0,6**	1,7 $\pm$ 0,05**	1,1 $\pm$ 0,08	7,5 $\pm$ 0,1
Indometacina	5,0	1,8 $\pm$ 0,5**	0,8 $\pm$ 0,2**	1,0 $\pm$ 0,5**	0,6 $\pm$ 0,4**

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com Cg \*\*  $p < 0,01$ .



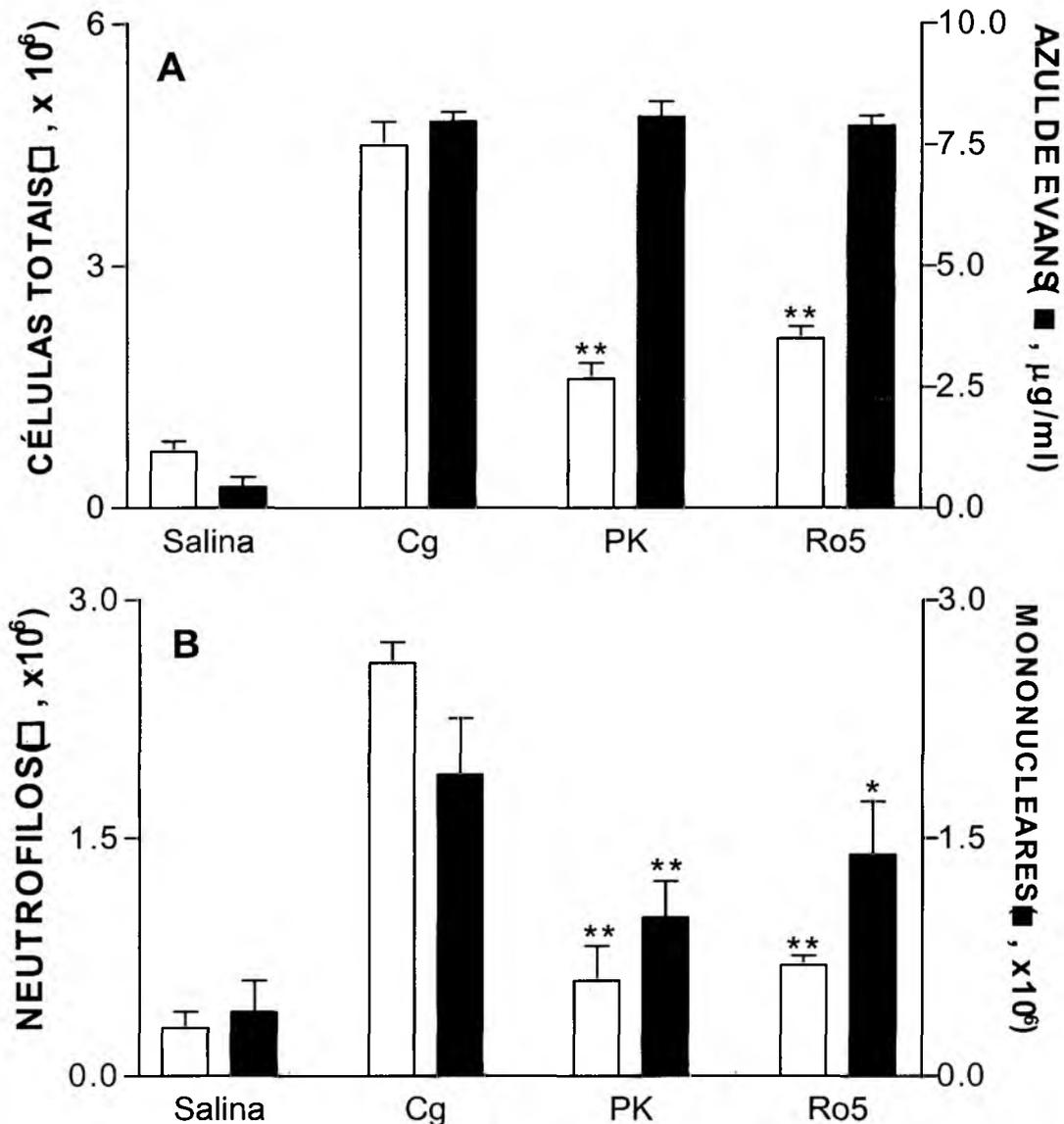
**Figura 22** - Efeito do PK11195 e do Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrados 12 h antes da Cg sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina 1%/cav em camundongos. **A** – (Cg) representa animais do grupo controle tratados com carragenina e (salina) representa o grupo controle tratado com salina, ambos via intratorácica (i.t.). As colunas abertas representam as células totais (x 10<sup>6</sup>) e as colunas fechadas representam a exsudação (µg/ml). **B** - as colunas fechadas indicam os mononucleares (x 10<sup>6</sup>) e as colunas abertas indicam os neutrófilos (x 10<sup>6</sup>). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos de 6 animais, e as barras verticais, o E.P.M. Os asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Cg) \*\* p<0,01.

**Tabela 19** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 12 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%/cav, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).

Grupos	Dose (mg/kg)	Células Totais ( $\times 10^6$ )	Neutrófilos ( $\times 10^6$ )	Mononucleares ( $\times 10^6$ )	Exsudato ( $\mu\text{g/ml}$ )
Salina	-	0,6 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
Carragenina	-	5,1 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,2	8,9 $\pm$ 0,4
PK11195	0,1	2,6 $\pm$ 0,1**	1,0 $\pm$ 0,3**	1,6 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 0,5
Ro5-4864	0,1	2,7 $\pm$ 0,1**	1,1 $\pm$ 0,5**	1,6 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 0,5
Indometacina	5,0	1,8 $\pm$ 0,5**	0,8 $\pm$ 0,2**	1,0 $\pm$ 0,5**	0,6 $\pm$ 0,4**

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com Cg \*\*  $p < 0,01$ .



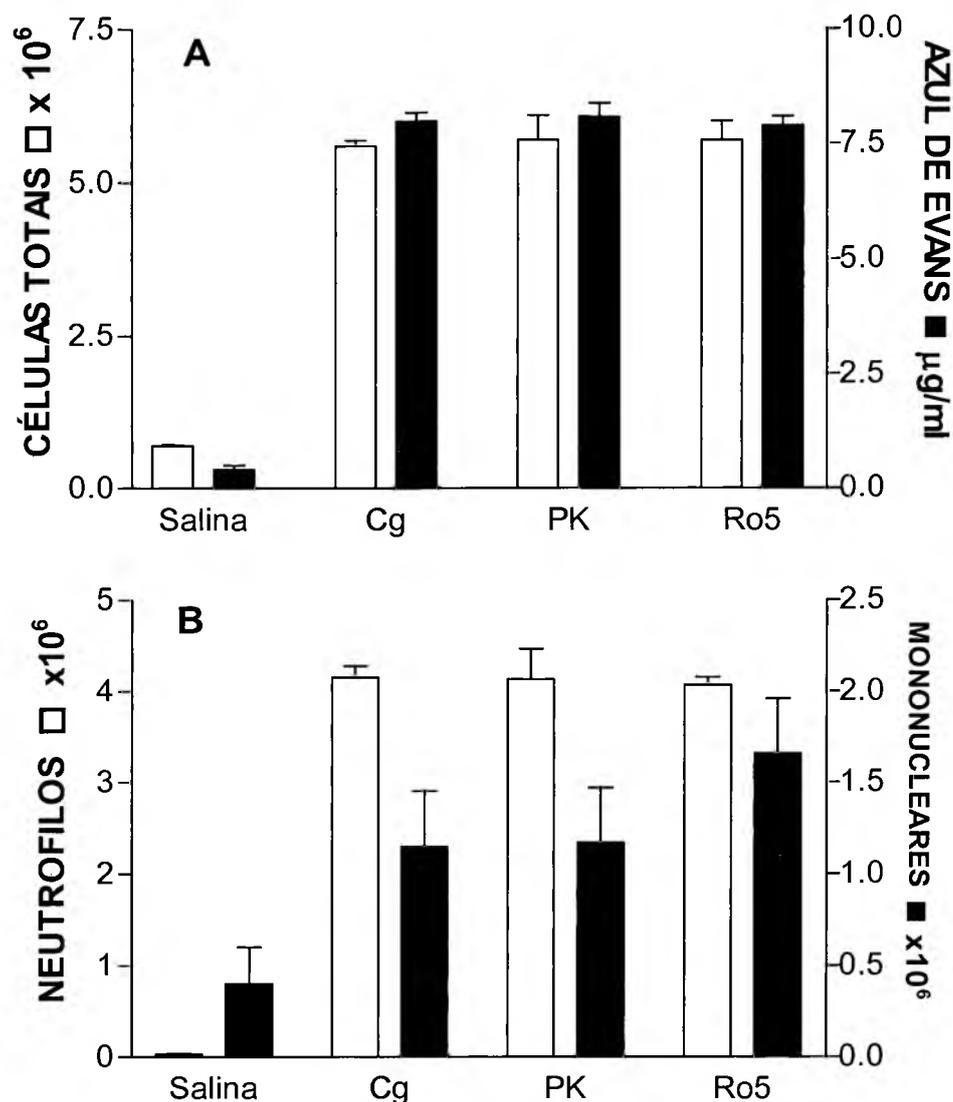
**Figura 23** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrados 24 h antes sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida pela carragenina 1%/cav em camundongos. **A** – (Cg) representa animais do grupo controle tratados com carragenina e (salina) representa o grupo controle tratado com salina, ambos via intratorácica (i.t.). As colunas abertas representam as células totais (x 10<sup>6</sup>) e as colunas fechadas representam a exsudação (μg/ml). **B** - as colunas fechadas indicam os mononucleares (x 10<sup>6</sup>) e as abertas indicam os neutrófilos (x 10<sup>6</sup>). Cada coluna e representam a média dos resultados obtidos de 4 a 6 animais, e as barras verticais, o E.P.M. Os asteriscos fora das colunas indicam as diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Cg) \* p<0,05 ou \*\* p<0,01.

**Tabela 20** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).

Grupos	Dose (mg/kg)	Células Totais ( $\times 10^6$ )	Neutrófilos ( $\times 10^6$ )	Mononucleares ( $\times 10^6$ )	Exsudato ( $\mu\text{g/ml}$ )
Salina	-	0,7 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
Carragenina	-	4,5 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,2
PK11195	0,1	1,6 $\pm$ 0,2**	0,6 $\pm$ 0,1**	1,0 $\pm$ 0,2**	8,1 $\pm$ 0,3
Ro5-4864	0,1	2,1 $\pm$ 0,1**	0,7 $\pm$ 0,06**	1,4 $\pm$ 0,3*	7,9 $\pm$ 0,2
Indometacina	5,0	1,8 $\pm$ 0,5**	0,8 $\pm$ 0,2**	1,0 $\pm$ 0,5**	0,6 $\pm$ 0,4**

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com Cg \* $<$  0,05 \*\*  $p<$ 0,01.



**Figura 24** - Efeito do PK11195 (PK) e do Ro5-4864 (Ro5) (0,01 mg/kg; i.p.) administrados 24 h antes sobre a migração celular e exsudação na primeira fase (4 h) da pleurisia induzida por carragenina 1%/cav em camundongos. **A** – (Cg) representa animais do grupo controle tratados com carragenina e (salina) representa o grupo controle tratado com salina, ambos via intratorácica (i.t.). As colunas abertas representam as células totais ( $\times 10^6$ ) e as colunas fechadas representam a exsudação ( $\mu\text{g/ml}$ ). **B** - as colunas fechadas indicam os mononucleares ( $\times 10^6$ ) e as abertas indicam os neutrófilos ( $\times 10^6$ ). Cada coluna e representa a média dos resultados obtidos de 6 animais, e as barras verticais, o E.P.M.

**Tabela 21** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 (0,01 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1%/cav, em camundongo na primeira fase do processo inflamatório (4h).

Grupos	Dose (mg/kg)	Células Totais ( $\times 10^6$ )	Neutrófilos ( $\times 10^6$ )	Mononucleares ( $\times 10^6$ )	Exsudato ( $\mu\text{g/ml}$ )
Salina	-	0,7 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,1
Carragenina	-	5,6 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,03	8,0 $\pm$ 0,2
PK11195	0,1	5,7 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,02	8,1 $\pm$ 0,3
Ro5-4864	0,1	5,7 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,08	1,6 $\pm$ 0,03	7,9 $\pm$ 0,2
Indometacina	5,0	1,8 $\pm$ 0,5**	0,8 $\pm$ 0,2**	1,0 $\pm$ 0,5**	0,6 $\pm$ 0,4**

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle tratado com Cg \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.8 - EFEITO DO PK11195 E DO Ro5-4864 NOS NÍVEIS DE IL-6 e IL-13 NO MODELO DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS (4 h)

A aplicação de carragenina (1%/cav) na cavidade pleural de camundongos tratados com PBS 24 h antes (grupo controle) induziu significativamente o aumento dos níveis de IL-6 ( $667 \pm 0.3$  pg/ml) e IL13 ( $8.000 \pm 600$  pg/ml).

Sendo que o nível de IL-6 e IL-13 na cavidade pleural diminuiu significativamente, em relação ao grupo controle (Cg), quando os animais foram tratados previamente com PK1195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h antes da pleurisia induzida pela carragenina 1% em camundongos na primeira fase do processo inflamatório (4 h).

Não foi detectados IL-6 no exsudato dos animais tratados com os ligantes PBR e os níveis de IL-13 foram reduzidos para  $49 \pm 3,0$  pg/ml nos animais que receberam PK11195 e  $50 \pm 3,5$  pg/ml nos animais tratados com Ro5-4864.

Os animais tratados previamente com PK1195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.) administrado 24 h sem indução pela carragenina foi observado que os níveis dessas citocinas não foi alterado (Tabela 22).

**Tabela 22** - Efeito do PK11195 e Ro5-4864 nos níveis de IL-6 e IL-13 no lavado alveolar no modelo da pleurisia induzida pela carragenina 1%, em camundongos, na primeira fase do processo inflamatório (4 h).

Grupos	IL-6 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)
Salina	0	45±2,0
Carragenina	667±0.3	8.000±600
RO5-4864	0	36±2,5
PK11195	0	23±2,0
Ro5-4864 + Carragenina	0**	50±3,5 **
PK11195 + Carragenina	0**	49±3,0 **

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 5 a 10 animais.

Difere significativamente do grupo controle \*\* p<0,01.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento *in vivo* com os ligantes PBR, em camundongos, exerceram um efeito inibitório na resposta inflamatória em dois modelos de inflamação aguda. No primeiro modelo, mostramos que PK11195 e Ro5-4864 inibiram a formação do edema de pata induzido pela carragenina de maneira dose-dependente. Em animais adrenalectomizados ou não, foi demonstrado que o efeito antiinflamatório dos ligantes PBR não se deve exclusivamente a uma liberação de glicocorticóides provenientes da adrenal.

O desenvolvimento do edema de pata após a injeção de carragenina tem sido descrito como um evento bifásico onde vários mediadores agem seqüencialmente, para produzir a resposta inflamatória (Vinegar *et al.*, 1969; Henriques *et al.*, 1987). A fase inicial da formação do edema de pata em ratos (1-2h) caracteriza-se pela liberação de histamina, 5-HT, bradicinina, PAF e substância P (Di Rosa *et al.*, 1971; Hwang *et al.*, 1986; Gilligan *et al.*, 1994). A segunda fase (3-4 h) é mantida principalmente pela liberação de prostaglandina (Di Rosa e Willoughby, 1971). O óxido nítrico (NO) produzido pela forma constitutiva da óxido nítrico sintase parece estar envolvido na primeira fase do processo inflamatório do edema de pata induzido pela carragenina, enquanto que o óxido nítrico produzido pela óxido nítrico sintase induzida, parece ser necessária para a manutenção da segunda fase da resposta inflamatória (Salvemini *et al.*, 1993).

Henriques *et al.*, (1987). Por meio de análises histológicas da área sub-plantar de camundongo, estudos revelaram que após a injeção de carragenina a infiltração celular predominante é de neutrófilos polimorfonucleares. Sabe-se que os neutrófilos

são potencialmente capazes de liberarem agentes inflamatórios, como aminas vasoativas (histamina e 5-HT), prostaglandinas, fatores quimiotáticos, leucotrienos, PAF e componente lisossomal, e que sua ativação também contribui para esta resposta inflamatória (Hurley, 1983).

Como já foi mencionado na introdução, apesar de alguns estudos mostrarem o PK11195 como antagonista e Ro5-4864 como agonista do PBR (Le Fur *et al.*, 1983; e Parola *et al.*, 1993), a significância funcional de cada classificação é ambígua, podendo variar, na qual o PK11195 e Ro5-4864 mostraram ter efeitos similares em vários modelos experimentais (Mukhin *et al.*, 1989; Papadopoulos *et al.*, 1990). Por exemplo, os macrófagos originários de camundongos tratados com PK11195 e Ro5-4864 tiveram ações similares, exercendo efeito inibitório na resposta fagocítica oxidativa, e na capacidade dos macrófagos em produzirem IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Zavala *et al.*, 1990).

Para o entendimento do exato mecanismo de ação de drogas antiinflamatórias, é necessário conhecer melhor o papel de cada mediador no processo inflamatório. Apesar da complexidade da interpretação dos diferentes dados sobre a interdependência dos efeitos entre os diferentes mediadores inflamatórios, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de classificar esta questão. Por exemplo, tem sido demonstrado que histamina, 5-HT, bradicinina, PGE<sub>2</sub> e PAF são potentes mediadores vasoativos, e alguns desses mediadores exercem seus efeitos também na migração de neutrófilos. Muitos desses reguladores inflamatórios são capazes de ativar o endotélio vascular, em parte por aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e também por induzir a expressão de moléculas de adesão.

A BK por exemplo, é capaz de aumentar a produção de citocina IL-6, envolvida na permeabilidade do endotélio vascular (Maruo *et al.*, 1992, Ishizu *et al.*, 1995, Paegelow *et al.*, 1995; Modeer *et al.*, 1998). A BK é um peptídeo vasoativo que desempenha importante função como mediador inflamatório, o qual é normalmente liberado em decorrência de trauma tecidual ou infecção, sendo que a BK causa relaxamento da arteríola e constrição de vênulas, aumentando a permeabilidade microvascular e promovendo extravasamento plasmático em muitas espécies. Com isso foi visto que a injeção intradérmica de BK produz uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade e aderência de neutrófilos (Polosa *et al.*, 1993). Vários estudos também mostraram que o edema de pata induzido pela BK em condições normais é mediado pela ativação de receptores do tipo B<sub>2</sub> (Whalley *et al.*, 1984; Campos, Tese 1997).

A pré-incubação de fibroblastos 3T3 com ésteres do forbol ou com análogos do diacilglicerol foi capaz de potencializar a síntese de PGE<sub>2</sub> estimulada pela BK, sendo que a mesma aumenta a síntese de prostanóides por causar a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (Burch e Axelrod, 1987; Burch *et al.*, 1988). Estudos subseqüentes mostraram que a síntese de prostanóides mediada pela BK pode ser potencializada pela IL-1 em fibroblastos sinoviais de humanos (Bathon *et al.*, 1992) ou por IL-1 e TNF em fibroblastos 3T3 e macrófagos (Burch *et al.*, 1988; Tiffany e Burch, 1989). Estudos realizados por Willians 1979 observaram que a PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> potencializaram o extravasamento plasmático induzido pela BK.

Alguns efeitos da bradicinina e substância P são devido a sua capacidade de induzir a liberação de histamina das células de mastócitos por liberação de cálcio de estoques de cálcio intracelulares Sendo assim, embora a BK possa causar contração e relaxamento de vasos sanguíneos através da estimulação de receptores B<sub>2</sub>, o

aumento da permeabilidade vascular pode estar relacionado com a estimulação direta da degranulação de mastócitos, e liberação de histamina (Dray, 1994). No entanto, este mecanismo não requer a ativação de receptores, mas a estimulação de moléculas de superfície que ativam a fosfolipase C, com conseqüente formação de inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O aumento de IP<sub>3</sub> resulta em influxo de cálcio intracelular (Lee *et al* 1993) enquanto que o DAG promove a ativação de isoformas específicas da proteína quinase C (Tipper *et al.*,1994), e é desta forma que os receptores B<sub>2</sub> induzem a liberação dos mediadores a partir dos mastócitos (Bueb *et al.*, 1990). A histamina é uma amina básica formada a partir da histidina, é encontrada em muitos tecidos, como no pulmão, pele e trato gastrointestinal. Em nível celular a histamina é encontrada principalmente em mastócitos e basófilos, onde fica armazenada em grânulos intracelulares, sendo liberada após traumas e processo inflamatórios (Scott *et al.*,1994).

A liberação de TNF por células do endotélio induz a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (moléculas de adesão intracelulares) e selectina-E (Miki *et al.*,1996). As selectinas medeiam a adesão e o início da marginalização dos leucócitos através de ligação fraca e reversível, que permite o rolamento das células nas paredes dos vasos (Spertini *et al.*, 1991). As moléculas de adesão do tipo selectinas E e P, expressas nas células endoteliais nos focos inflamatórios, 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 das células endoteliais, causado pela expressão de outras moléculas de adesão nos leucócitos: as  $\beta_1$  integrinas, também denominadas VLA-4 (*very late antigen*), importantes na adesão entre matriz e célula; e as  $\beta_2$  integrinas, responsáveis pela adesão célula a célula. Outro grupo de moléculas de adesão é o das imunoglobulinas, que são as moléculas

de adesão intercelular ICAM-1 e 2, moléculas de adesão vascular VCAM-1 e as relacionadas com as plaquetas PeCAM-1, sendo que a via CD18-ICAM-1 é utilizada por todos os leucócitos (Schroth, 1996). A produção de ICAM-1 é estimulada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 e o TNF- $\alpha$  (Schroth, 1996). As  $\beta_2$  integrinas interagem com as moléculas ICAM-1 das células endoteliais, enquanto as  $\beta_1$  integrinas interagem com as moléculas VCAM-1. Esta etapa constitui o pré-requisito para a migração dos leucócitos (Walzog *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram que os glicocorticóides diminuíram a habilidade das células endoteliais interferirem no tráfego de leucócitos para o tecido inflamado por inibição da expressão de moléculas de adesão, sugerindo um mecanismo pelo qual o antiinflamatório corticosteróide pode inibir ao acúmulo de leucócitos no sítio inflamado (Filep *et al.*, 1997).

A substância P, que medeia vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular, faz parte de um grupo importante de substâncias com caráter pró-inflamatório, exercendo sua atividade principalmente em receptores NK<sub>1</sub> estando distribuída no SNC e SNP em várias espécies animais (Otsuka e Yoshioka, 1993). É também um importante modulador de citocinas incluindo o TNF- $\alpha$  frente a várias células, como mastócitos, macrófagos e outras (Cocchiara *et al.*, 1997; Preval e Cantagrelm, 1998). Na pele de rato, a substância P induz vasodilatação mediada por receptores do tipo NK<sub>1</sub> (Maggi, 1995). A substância P também causa extravasamento plasmático através da liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (Brain e Williams, 1985). Foi demonstrado que no coelho a aplicação local de substância P causa vasodilatação na microvasculatura muscular esquelética, agregação plaquetária e de leucócitos (Öhien *et al.*, 1989). Em cobaias a substância P promove aumento da atividade fagocítica de macrófagos, liberação de enzimas lisossomais, de ânions

superóxidos e de metabólitos do ácido araquidônico (Hartung *et al.*, 1986). Estudos feitos em cultura de fibroblastos sinovial incubados com citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IFN, TNF- $\alpha$ ) em presença de substância P, mostraram que a substância P potencia o efeito das citocinas pró-inflamatórias estimulando a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 (Lambert *et al.*, 1998). Os antagonistas da substância P diminuíram a liberação de histamina e da produção de TNF- $\alpha$  nas células de mastócitos (Sugimoto *et al.*, 1998). O TNF- $\alpha$  mostra estar implicado na migração de leucócitos e na liberação de histamina induzida pela substância P (Saban *et al.*, 1997; Brzezinska-Blaszczyk e Pietrzak, 1997; Lambert *et al.*, 1998). A substância P também influencia várias funções dos leucócitos polimorfonucleares, incluindo o *burst* respiratório (Brennan *et al.*, 1992). Quando os neutrófilos humanos foram expostos ao PAF, foi verificado aumento de substância P e produção de ânions superóxido ( $O_2^-$ ), sugerindo que o PAF possa ser capaz de amplificar a resposta oxidativa nos sítios inflamatórios (Gay *et al.*, 1986; Dianzani *et al.*, 1994).

O PAF é um fosfolípido produto de neutrófilos, macrófagos alveolares, monócitos e plaquetas; mostra provocar o edema por mecanismos dependentes de cálcio extracelular, mas independentes de histamina, serotonina e da atividade das prostaglandinas (Goldenberg e Meurer, 1984). O PAF induziu o acúmulo de neutrófilos intravascular, sendo com isso considerado um potente mediador nas respostas inflamatórias (Archer *et al.*, 1985). Além disso, o PAF e o TNF mostraram agir sinergicamente aumentando a adesão endotelial, pela expressão de ICAM-1 e E-selectina (Sternier-Kock *et al.*, 1996). A IL-1 $\beta$  e a IL-6 promovem a síntese de PAF em células sinoviais, que por sua vez age com outros mediadores amplificando a resposta inflamatória (Gutierrez *et al.*, 1995). O PAF também modula a produção de IL-6 e fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) nas

células endoteliais, o qual pode contribuir para resposta local, e possivelmente sistêmica durante a inflamação (Bussolino *et al.*,1990; Lacasse *et al.*,1997). O edema de pata induzido pela carragenina em ratos teve uma inibição do edema na primeira fase em presença dos antagonistas do PAF, sendo que na segunda fase esse bloqueio deixou de existir. Além disso, os antagonistas do PAF potenciaram o efeito inibitório da indometacina, sugerindo que o PAF possa estar envolvido na biosíntese de prostaglandinas, as quais iniciam a segunda fase do edema (Hwang *et al.*,1986).

As prostaglandinas, produto da via do ácido araquidônico, são reguladas pelas isoformas das ciclooxigenase 1 (COX-1) constitutiva, e ciclooxigenase 2 (COX-2) induzida. A expressão da COX-2 é induzida por diferentes estímulos inflamatórios como endotoxinas, IL-1, TNF e IL-13 no macrófago, fibroblastos, células endoteliais e neutrófilos (Anderson *et al.*,1996). A carragenina também aumenta a expressão da COX-2 na epiderme, músculo esquelético e células inflamatórias no modelo de edema de pata, sugerindo que a produção de PGE<sub>2</sub> é ligada à expressão de COX-2 (Nantel *et al.*,1999). O aumento da síntese de PGE<sub>2</sub> causa indução de IL-6, e a expressão de COX-2 mostra estar mediando este processo (Hinson *et al.*, 1996). A IL-1-β causa a indução de COX-2 nas células de músculo liso vascular (Bishop-Bailey *et al.*,1998; 1999).

A formação de edema é dependente de um sinergismo entre os mediadores que aumentam a permeabilidade vascular, e os mediadores que aumentam o fluxo sanguíneo (vasodilatação). No modelo do edema na pele do dorso de coelho a PGE<sub>2</sub> apresentou pequeno efeito no extravasamento plasmático, quando injetada isoladamente, entretanto, PGE<sub>2</sub> potencializou o extravasamento plasmático induzido pela bradicinina, porém esta prostaglandina foi potente em aumentar o fluxo sanguíneo (Williams, 1979).

No modelo de pata de rato, quando a PGE<sub>2</sub> foi administrada por via intraplantar foi observado aumento do edema, indicando que neste modelo experimental, esta prostaglandina interferiu tanto na vasodilatação como extravasamento plasmático de uma forma direta ou indiretamente (Katz *et al* 1984 e Tratsk *et al* 1997).

A amina vasoativa, 5-HT, tem um papel importante na alteração do tônus e da permeabilidade vascular, os quais contribuem para o extravasamento plasmático, sendo a injeção intraplantar desta amina muito utilizada como modelo inflamatório em rato (Sufka *et al.*,1991) e em camundongo (Oyanagui, 1984). O edema de pata induzido pela 5-HT mostra que os inibidores da ciclooxigenase (indometacina e aspirina) (Holsappie *et al.*, 1980; Oyanagui, 1984) não inibiram o edema da 5-HT, sugerindo que os metabólitos do ácido araquidônico não participam deste modelo (Amico-Roxas *et al.*, 1989; Cole *et al.*,1995). A 5-HT parece inibir os leucócitos mononucleares de maneira significativa mas não os leucócitos polimorfonucleares (Bondesson *et al.*,1993). A 5-HT induziu a produção de fator quimiotático para linfócitos (IL-16) em cultura de células mononucleares, sugerindo assim que a 5-HT promove o recrutamento de linfócitos T (CD4+) os quais estão implicados na resposta inflamatória (Laberge *et al.*,1996).

O TNF- $\alpha$  e a 5-HT são encontrados no sítio inflamatório, sugerindo que o TNF- $\alpha$  possa estar envolvido na renormalização dos níveis de 5-HT (Mossner *et al.*, 1998).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina, por ação de uma família de enzimas: as óxido nítrico sintases (NOS). O NO participa de várias funções fisiológicas, sendo mediadas pela ativação da guanilato ciclase e conseqüente aumento da concentração de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) nas células alvo (Ignarro, 1991). O NO está envolvido na inflamação aguda, sendo que a formação do edema é aumentada pela L-arginina e diminuída pelos inibidores da NOS (Ialenti *et*

*al.*,1992). Três isoformas da NOS são conhecidas, duas das quais são formas constitutivas: a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) expressa no endotélio, e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) expressa no tecido neuronal. Estas isoformas estão presentes no citosol, e sua resposta é regulada pela concentração de  $Ca^{+2}$  e da calmodulina (Forstermann *et al.*,1991). A terceira isoforma da enzima tem sua expressão induzida (iNOS) por estímulos imunológicos ou inflamatórios ou por uma variedade de mediadores como as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN-gama, após ativação de macrófagos, de células endoteliais e também por outras células (Moncada *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993). Alguns estudos mostraram que IL-6 e TNF- $\alpha$  induzem a iNOS, aumentando o NO. A citocina TNF- $\alpha$  induz a expressão de NO sintase nas células do músculo liso vascular, e o TNF e a IL-1 $\beta$  agem sinergicamente para induzir a expressão e a atividade da iNOS (Beasley e Eldridge, 1994). Resultados similares também foram obtidos em células de hepatócitos estimuladas com LPS onde foi observado aumento da produção de NO (Saad *et al.*, 1995). Células endoteliais estimuladas com IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  aumentaram as suas propriedades de adesividade, causando a expressão de iNOS. O NO gerado contribuiu para a modulação das moléculas de adesão nas células endoteliais. O NO estimula a atividade da COX resultando na produção exacerbada de mediadores pro-inflamatórios: as prostaglandinas (Salvemini *et al.*,1993).

Os inibidores não seletivos das NOS diminuíram em 90% o edema de pata induzido no período de quatro horas após a injeção de carragenina, sugerindo que o NO tem um papel importante na primeira fase deste processo infamatório (Salvemini *et al.*,1993; 1994).

Em nosso estudo, demonstramos que os ligantes PBR diminuíram o edema de pata induzido por diferentes mediadores inflamatórios, como a histamina, substância

P, bradicinina, PGE<sub>2</sub>, PAF e L-arginina. Somente o edema de pata induzido pela 5-HT não foi inibido pelos ligantes PK11195 e Ro5-4864.

A ação inibitória dos ligantes PBR no edema de pata induzido pela via da L-arginina, vem confirmar os resultados obtidos em nossos experimentos de edema de pata induzido pelos mediadores da inflamação. Isso, baseando-se no modelo proposto por Salvemini *et al.*,(1996) para explicar o mecanismo de ação do NO no modelo do edema de pata induzido pela carragenina. Neste modelo os autores sugerem que na primeira hora seguido da injeção de carragenina, o edema é mediado pela liberação de histamina, 5-HT e bradicinina . Estes mediadores, ativando seus receptores nas células endoteliais, ativam a NOS constitutiva gerando assim NO. Com a progressão da resposta inflamatória a iNOS será induzida por um mecanismo provavelmente dependente de citocinas, TNF e IL-1, levando assim à geração de quantidades maiores de NO , o qual parece manter o edema durante uma fase mais tardia.

Desta forma poderia-se hipotetizar baseando-se neste modelo e em nossos resultados que os ligantes PBR inibem o edema produzido pela via da L-arginina, pelo fato de inibirem a ação da bradicinina e da histamina, o que impede a ativação da NOS constitutiva e conseqüentemente a liberação de NO na primeira fase do edema de pata. A inibição de IL-1 e TNF pelos ligantes PBR impediria a ativação da iNOS diminuindo assim a segunda fase do edema.

Embora não se tenha conhecimento da possível participação da IL-13 no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, esta citocina tem sido descrita em vários modelos como uma citocina com atividades preferencialmente antiinflamatórias, inibindo diferentes citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-8. Também tem sido mostrado que a IL-13 induz a expressão e a produção do

antagonista IL-1 (IL-1ra), potenciando sua ação antiinflamatória (Girardi *et al.*,1996). Resultados similares foram obtidos em macrófagos e monócitos humanos, onde foi demonstrado que a IL-13 causou aumento da produção da IL-1ra (Orino *et al.*,1992). Outros resultados demonstraram que a IL-13 age diminuindo a atividade da enzima ciclooxigenase do tipo 2 (COX 2), afetando a produção de PGE<sub>2</sub> em monócitos humanos (Mertz *et al.*,1994; Endo *et al.*,1996); e fibroblastos sinoviais acrescidos de IL-13 reduziram a indução do TNF $\alpha$  diminuindo conseqüentemente a PGE<sub>2</sub> via COX-2 (Alaaeddine *et al.*,1999). Todavia a IL-13 pode causar inflamação em algumas situações específicas. Por exemplo, a expressão pulmonar da IL-13 induz uma inflamação no tecido pulmonar de camundongos, sendo caracterizada pela infiltração de células mononucleares, aumento significativo de eosinófilos e macrófagos alveolares; mostrando também ser um indutor potente na hipertrofia de células das vias aéreas epiteliais, hiperplasia da glote, produção aumentada de muco e assim como causa de fibrose e obstrução das vias aéreas (Zhu *et al.*,1999).

A IL-13 inibe o edema de pata induzido pela carragenina, porém em nosso estudo observamos que a IL-13 foi capaz de inibir a ação antiedematogênica dos ligantes PBR, quando administrada por via intraplantar cinco minutos antes da carragenina; sugerindo assim que os ligantes PBR poderiam intervir na liberação de certas citocinas antiinflamatórias, e que a ação da IL-13 não seria devido a ela própria, mas devido ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Não são conhecidos os mecanismos pelos quais os ligantes PBR exercem sua ação antiinflamatória. A ativação da biosíntese de esteróides é uma função bem caracterizada do PBR, não somente em tecidos esterogênicos clássicos como o adrenal (Besman *et al.*, 1989), placenta (Barnea *et al.*,1989), testículo (Papadopoulos *et al.*,1990) e células ovarianas (Amsterdam e Suh, 1991), mas também nas células

de Schwann e na glia (Papadopoulos *et al.*, 1992; Lacor *et al.*, 1999). Os ligantes PBR têm a capacidade de aumentar a translocação de colesterol da membrana externa para membrana interna mitocondrial, uma etapa primordial da esteroidogênese (Krueger, 1995). No cérebro, o PBR é aumentado em várias situações patológicas onde reações inflamatórias em tecidos nervosos se fazem presente (Mossner *et al.*, 1998; Raghavendra *et al.*, 2000).

A densidade de PBR e os níveis de DBI, um suposto ligante endógeno do PBR, foram aumentados na degeneração do nervo ciático, e a administração de Ro5-4864 (i.p.) induziu um aumento significativo dos níveis de pregnenolona no plasma e no nervo ciático, sugerindo que o Ro5-4864 possa estimular a síntese de pregnenolona não somente em órgãos esterogênicos como gônadas e glândula adrenal, mas também localmente, no nervo ciático (Lacor *et al.*, 1999). Os ligantes PBR reduzem a liberação de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  dos macrófagos (Zavala *et al.*, 1990a). Além das células nervosas e dos tecidos esteroidais clássicos (ovário, testículos, adrenais), existem outros locais onde há possibilidade de síntese de esteróides. Por exemplo, a síntese de esteróides tem sido demonstrada nos timócitos e parede vascular, onde há presença de PBR e da enzima P450<sub>scc</sub>, a qual é responsável pela transformação do colesterol em pregnenolona, uma etapa primordial para a biosíntese de esteróides (Takeda *et al.*, 1994; Jenkinson *et al.*, 1999). Existem evidências da síntese de esteróides no sistema cardíaco, onde o PBR está presente (Le Fur *et al.*, 1983; French e Matlib, 1988).

Desta forma pode ser hipotetizado que os ligantes PBR exercem ação antiinflamatória via síntese de esteróides, os quais poderiam diminuir a liberação de diferentes interleucinas pró-inflamatórias e conseqüentemente inibir a ação de diferentes mediadores inflamatórios. Esta possível estimulação da síntese de

esteróides pode se dar no sítio Inflamatório e em diferentes células que possam sintetizar esteróides.

No edema de pata, onde existe um aumento da migração de neutrófilos após injeção de carragenina, os ligantes PBR têm a habilidade em inibir a liberação de diferentes interleucinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , que ao ser liberada aumentaria a expressão das moléculas de adesão ICAM-1, que por sua vez ativaria vários mediadores envolvidos na inflamação, sendo dessa forma que ação a antiinflamatória dos ligantes PBR poderia estar implicada. Muitos estudos têm mostrado que a IL-6, uma citocina que aumenta a permeabilidade vascular (Maruo *et al.*, 1992; Ishizu *et al.*, 1995; Akagi *et al.*, 1998), tem sua produção induzida pela PGE<sub>2</sub>, histamina, bradicinina e PAF (Deineste *et al.*, 1994; Paegelow *et al.*, 1995; Hinson *et al.*, 1996; Portanova *et al.*, 1996; Lacasse *et al.*, 1997). Esses achados sugerem que a IL-6 contribua para a permeabilidade vascular causada por esses diferentes mediadores. Desta forma, pode-se pressupor que os ligantes PBR possam inibir o edema induzido pela BK, histamina, PAF e PGE<sub>2</sub>, em parte pela inibição da liberação de IL-6. A potente inibição da liberação de TNF- $\alpha$  pelos ligantes PBR pode ser em parte, responsável pela inibição do edema de pata induzido pela substância P. E a inabilidade do PK11195 e Ro5-4864 em inibir o edema de pata induzido pela 5-HT pode ser devido à diminuição da liberação de TNF- $\alpha$ .

Para avaliar a atividade antiinflamatória do PK11195 e Ro5-4864 sob o ponto de vista quantitativo, não somente com relação ao extravasamento de líquidos, mas também às alterações na celularidade, utilizamos o modelo da pleurisia induzida pela carragenina (De Brito 1989; Saleh *et al.*, 1996).

A injeção de carragenina 4h após, na cavidade pleural promove uma intensa reação inflamatória com formação de exsudato gerado principalmente por neutrófilos,

além de mastócitos e vários outros mediadores inflamatórios (Horakova *et al.*, 1980; De Brito, 1989, Saleh *et al.*, 1996). Vários mediadores têm sido detectados no exsudato pleural induzido pela carragenina entre eles a histamina, 5-HT, BK, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e LTB<sub>4</sub> (Horakova *et al.*, 1980; Katori *et al.*, 1980; Mikami e Miyasaka, 1983; Raychaudhuri *et al.*, 1997).

A inflamação produzida na cavidade pleural é lenta e prolongada em comparação com aquela desenvolvida na pele. Isto se deve ao fato de haver diferenças nas respostas ao mediador inflamatório, na drenagem linfática bem como nos tipos celulares envolvidos. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório (Doherty *et al.*, 1976; Glatt *et al.*, 1979).

O tratamento prévio com PK11195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg por via i.p. 24 h antes da aplicação do agente flogístico), inibiu de maneira significativa a migração celular principalmente de neutrófilos. Os ligantes do receptor PBR, PK11195 e Ro5-4864, administrado 1 h, 12 h e 24 h, não foram efetivos em inibir o extravasamento plasmático induzido pela carragenina na cavidade pleural. A dose de 0,01 mg/kg de PK11195 e Ro5-4864 24 h antes do agente flogístico, não foi efetiva em inibir a migração celular nem a exsudação.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina, existe a evidência da participação de mediadores inflamatórios; e é bem conhecido que neste modelo a BK e a substância P estão envolvidas na formação do exsudato. No modelo da pleurisia induzida pela bradicinina seus efeitos são mediados pela ativação dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> constitutivos (Saleh *et al.*, 1996; Vianna e Calixto, 1998), com relação à exsudação e à migração celular, sendo que a exsudação é também mediada pelas taquicininas de fibras nervosas sensoriais (Ricciardolo *et al.*, 1994), evidenciando uma ligação

importante entre as taquicininas e as cininas na inflamação neurogênica. As taquicininas também liberam histamina, o que contribui para aumentar a permeabilidade vascular (Donnerer e Amann, 1993). Na pleurisia induzida pela carragenina a bradicinina é liberada, e esta parece ser um importante mediador na indução da formação de prostaciclina ( $PGI_2$ ), que juntas aumentam a exsudação no processo inflamatório (Ueno *et al.*, 2000). Muitos outros estudos feitos em ratos mostram outros mediadores envolvidos na exsudação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, entre eles os eicosanóides e as citocinas (Utsunomiya *et al.*, 1991; Oh-ishi, 1997).

A migração de neutrófilos no exsudato da pleurisia induzida pela carragenina mostra ser em parte causada por citocinas, como a IL-1 e a IL-6 (Oh-Ishi, 1997). A IL-6 é um mediador importante produzido por vários tipos de células, incluindo os polimorfonucleares, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, linfócitos T e B. A regulação da produção da IL-6 é um passo importante na homeostase biológica, pois a produção aumentada de IL-6 tem sido associada em grande número de doenças. Estudos feitos com leucócitos estimulados pelo LPS induziram um aumento na produção de IL-6, e após tratamento com dexametasona este efeito foi inibido significativamente, logo que essa ação inibitória foi mediada pela inibição da produção da IL-6 (Mianji *et al.*, 1996). Em outros estudos com fibroblastos tratados com glicocorticóides, foi observado uma inibição da indução de IL-1, que em condições normais induz a produção de IL-6 (Zitnik *et al.*, 1994). Supondo que a IL-6 tenha um papel similar nos modelos da pleurisia de camundongo e rato, que os ligantes PBR causem inibição da migração de neutrófilos na pleurisia, e sugerindo-se que esse efeito seja mediado via estimulação da síntese de esteróides a qual inibem a produção de IL-1 e IL-6.

A não inibição do extravasamento pode ser causada pela incapacidade do ligante PBR em diminuir o mediador envolvido na exsudação vascular, dentro da cavidade pleural, que foi induzida pela carragenina. Os mediadores envolvidos nos modelos do edema de pata e da pleurisia são diferentes. O exsudato liberado na cavidade pleural em camundongo mostra ser devido à liberação de mediadores de neutrófilos, além de células de mastócitos que tem a capacidade de produzir a IL-13. Os glicocorticóides suprimem a expressão e a produção de IL-13 por células de mastócitos de pulmão (Fushimi *et al.*, 1998).

Nossos estudos mostraram que PK11195 e Ro5-4864 foram potentes inibidores da produção de IL-13 no exsudato pleural. A IL-13 tem sido descrita como uma citocina antiinflamatória em vários modelos experimentais, por exemplo, aumentando a produção e proliferação de células B, e por inibição da produção de citocinas inflamatórias (Hancock *et al.*, 1998). Mas ao contrário disso, a IL-13 causa inflamação quando expressa seletivamente no pulmão de camundongo, e em indivíduos com fibrose pulmonar onde foi observado aumento do mRNA da IL-13 em macrófagos alveolares, sugerindo o envolvimento da IL-13 no desenvolvimento dessas doenças (Zhu *et al.*, 1999), também aumentando a fagocitose de neutrófilos (Yu *et al.*, 1998). Além disso, nossos dados mostraram que os ligantes PBR induziram uma completa inibição das citocinas IL-6 e IL-13 no exsudato pleural, e esta inibição mostra ter uma importante contribuição na diminuição no processo inflamatório, sem, contudo inibir a exsudação, sugerindo que neste modelo a IL-13 tenha um papel pró-inflamatório, e que a sua inibição faz com que o processo inflamatório não aumente. Os resultados apresentados foram ao encontro dos achados anteriores do envolvimento do PBR na resposta inflamatória. Nossos estudos demonstraram que PK11195 e Ro5-4864 foram potentes inibidores de IL-6 e IL-13 no modelo da pleurisia induzida pela carragenina

1%, em camundongos na primeira fase do processo inflamatório (4h). Os níveis dessas citocinas na cavidade pleural diminuíram significativamente em relação ao grupo controle (carragenina), quando os animais foram tratados previamente com PK1195 e Ro5-4864 (0,1 mg/kg; i.p.), 24 horas antes do agente flogístico. Os dados obtidos em nosso estudo sugerem que o PBR tenha propriedades antiinflamatórias por sua capacidade de inibir a ação de diferentes mediadores inflamatórios. Esse efeito pode ser devido principalmente à inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, que presumidamente causam a diminuição da expressão de moléculas de adesão, e conseqüentemente a inibição da migração de neutrófilos; porém a inibição da ativação da NOS constitutiva e induzida não podem ser descartadas.

A nossa proposta é de que este mecanismo de ação deva ser regulado parcialmente através da síntese de glicocorticóides no local da injúria e em tecidos capazes de sintetizar esteróides, mas este mecanismo de ação é hipotético e necessita ser confirmado. Em conclusão, os ligantes PBR têm interesse farmacológico como potentes agentes antiinflamatórios, por exemplo, em doenças pulmonares onde ocorre um excessivo influxo de neutrófilos e um aumento de citocinas como a IL-6 e a IL-13.

## 6. PUBLICAÇÕES

Os dados apresentados neste trabalho deram origem às seguintes publicações:

TORRES, S.R.; FRÖDE, T.S.; NARDI, G.M.; VITA, N.; REEB, R.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARGES, R.C. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, **408(2)**: 199-211, 2000.

TORRES, S.R.; NARDI, G.M.; FERRARA, P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARGES, R.C. Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. **Eur. J. Pharmacol** **385(2-3)**: R1-2, 1999.

## 7. RESUMO

1- O tratamento *in vivo* em camundongos com ligantes do receptor periférico benzodiazepínico (PBR) exerceram efeito inibitório na resposta inflamatória em dois modelos de inflamação aguda. No primeiro modelo o efeito antiinflamatório em diferentes tempos de pré-tratamento com os ligantes PBR, mostraram que a formação do edema em resposta a carragenina (300 µg/pata) foi inibida por PK11195 e Ro5-4864, em diferentes intervalos de tempo. O estudo do tempo resposta mostrou que a melhor resposta com ambos ligantes foi ótima em animais injetados no tempo de 24h, por esta razão este tempo de pré-tratamento foi escolhido para estudo da dose resposta. A formação do edema de pata em resposta a carragenina (300 µg/pata) foi reduzida por PK11195 e Ro5-4864 em diferentes doses (0,00001-10mg/kg, i.p.) produzindo uma inibição dose dependente na formação do edema de pata em camundongos induzida pela carragenina.

2- Os ligantes PBR administrado na dose de 0.1 mg/kg i.p., 24 h antes da injeção da carragenina, inibiram significativamente o edema de pata em animais contendo ou não as glândulas adrenais, demonstrando que a ação desses ligantes não seja exclusivamente a uma liberação de glicocorticóides provenientes das adrenais.

3- PK11195 e Ro5-4864 (0.1 mg/kg, i.p.) quando administrado 24 h antes da indução do edema, inibiram de forma significativa o edema de pata de camundongos induzido pela histamina (100 nmol/pata), bradicinina (3 nmol/pata), substância P (10 nmol/pata), PGE<sub>2</sub> (30 nmol/pata) e PAF (10 nmol/pata). Nenhuma

inibição significativa foi observada no edema induzido pela 5-HT (10 nmol/pata) por PK11195 e Ro5-4864. Assim poderia ser postulado que os ligantes PBR possam exercer inibição do edema induzido pela bradicinina, histamina, PAF e PGE<sub>2</sub>, em parte, via inibição da liberação de IL-6. A potente inibição dos ligantes PBR na liberação de TNF poderia ser uma explicação para a inibição do edema induzido pela substância P. A inabilidade dos ligantes PBR em inibirem o edema de pata induzido pela 5-HT poderia ser explicada pela diminuição na liberação de TNF pelos ligantes PBR.

4- O edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) foi significativamente aumentado pela co-injeção de L-arginina (15 µmol/pata) quando comparado com edema induzido somente pela carragenina. A co-injeção de L-NAME (15 µmol/pata) inibiu significativamente o edema induzido pela carragenina. O PK11195 e Ro5-4864 inibiram a ação edematogênica da L-arginina quando co-injetada com a carragenina.

5- A IL-13 inibe o edema de pata induzido pela carragenina, porém reverte os efeitos antiinflamatórios do PK11195 e Ro5-4864, sugerindo que os ligantes PBR devam intervir na liberação de certas citocinas antiinflamatórias que poderiam ser mediadas pela IL-13 e que a ação da IL-13 não seria devido a ela própria, mas devido ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias.

6- No segundo modelo o pré-tratamento com os ligantes (0.1 mg/kg, i.p.), 24 h antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina, mostrou uma significativa inibição no recrutamento das células totais e diferenciais, principalmente a custos de

neutrófilos, inibindo também a liberação de Interleucina-13 (IL-13) e Interleucina-6 (IL-6) no líquido pleural produzida pela carragenina. Essa inibição da liberação mostra, em parte, contribuir para a redução do processo inflamatório, sem inibição da exsudação, sugerindo neste modelo que a IL-13 tenha um papel pró-inflamatório, por conta do fato que sua inibição não aumentou o processo inflamatório.

7- Nossos resultados estendem-se a achados anteriores, de que o PBR está envolvido na resposta inflamatória. Os dados obtidos neste estudo sugerem que os ligantes PBR tenham propriedades antiinflamatórias pela sua capacidade em inibir a ação de diferentes mediadores inflamatórios. Essa ação pode ser principalmente devido à inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, que presumidamente causam a diminuição da expressão de moléculas de adesão e conseqüentemente a inibição da migração de neutrófilos. Nossa proposta é de que o mecanismo de ação possa ser, em parte, pela regulação da síntese de glicocorticóides no local das lesões e em tecidos capazes de sintetizar esteróides, mas este mecanismo de ação antiinflamatório dos ligantes PBR é hipotético e necessita ser confirmado.

## 8. ABSTRACT

1- *In vivo* treatment of mice with peripheral benzodiazepine receptor (PBR) ligands exerts an inhibitory effect on inflammatory response in two models of acute inflammation. In the first model, the anti-inflammatory effect of different times of pre-treatment with PBR ligands have shown that paw-oedema formation in response to carrageenan (300 µg/paw) was reduced by PK 11195 and Ro5-4864 at different intervals of time. The time-course study indicated that the response of both ligands was optimal in animals injected 24 h, so for this reason we chose this time of pre-treatment for the dose-response studies. Show that paw-oedema formation in response to carrageenan (300 µg/paw) was reduced by PK 11195 and Ro5-4864 at different doses (0.00001 - 10 mg/kg, i.p.) producing a dose-dependent inhibition of formation of mouse paw oedema induced by carrageenan.

2- PBR ligands administered at dose of 0.1 mg/kg i.p., 24 h before carrageenan injection, significantly inhibited the paw-oedema in animals with or without adrenals glands, discarded the exclusive participation of endogenous glucocorticoids.

3- PK11195 and Ro5-4864 (0.1 mg/kg, i.p.) when administered 24 h before oedema-induction induced marked inhibition of mouse paw oedema induced by histamine (100 nmol/paw), bradykinin (3 nmol/paw), substance P (10 nmol/paw), PGE<sub>2</sub> (30 nmol/paw) and PAF (10 nmol/paw). No significant inhibition by PK11195 or Ro5-4864 was observed in 5-HT (10 nmol/paw) paw oedema induced. Thus, it could be postulated that PBR ligands may exert inhibition of oedema induced by bradykinin,

histamine, PAF and prostaglandin partly via inhibition of the release of IL-6. The potential of PBR ligands to inhibit the release of TNF could be a partial explanation of the inhibition of the oedema induced by substance P. The inability of PBR ligands to inhibit the paw-oedema induced by 5-HT could be explained by the down-regulation of the TNF release by PBR ligands.

4- The induced paw-oedema interplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was significantly enlarged by co-injection of L-arginine (15 µmol/paw) when compared with induced oedema only by carrageenan. The co-injection of L-NAME (15 µmol/paw) inhibited significantly-induced oedema by carrageenan. PK11195 and Ro5-4864 inhibited the action oedematogenic of the L-arginine co-injected with carrageenan.

5- The IL-13 inhibits the paw oedema induced by carrageenan, but it reverts anti-inflammatory effects of the PK11195 and Ro5-4864, suggesting that the PBR ligands should interfere in the release of certain anti-inflammatory cytokine that could be mediated by IL-13, and that the action of the IL-13 wouldn't be due to itself, but due to the increase of the synthesis of pro-inflammatory cytokines.

6- In the second model, the pre-treatment with PBR ligands (0.1 mg/kg, i.p.), 24 h prior to pleurisy induction induced by carrageenan, showed a significant inhibition of total and differential cell recruitment, especially on the expense of neutrophils, inhibiting of carrageenan-production of Interleukin-13 (IL-13) and Interleukin-6 (IL-6) in pleural exudation. This inhibition seems to contribute to the reduction of the inflammatory process, without inhibition of exudation suggesting that, in this model

IL-13 has a pro-inflammatory role on account of the fact that its inhibition does not up-regulate the inflammatory process.

7- Results presented here extend previous findings that PBR is involved in inflammatory responses. The collected data obtained in this study suggest that PBR ligands have anti-inflammatory properties by their capacity to inhibit the action of different inflammatory mediators. This action could be mainly due to the inhibition of the release of pro-inflammatory cytokines that presumably cause a decrease in the expression of adhesion molecules and consequently the inhibition of neutrophil migration. We propose that the whole mechanism of action could be regulated in part by glucocorticoid synthesis in local injuries and tissues able to synthesize steroids, but this hypothetical mechanism of anti-inflammatory action of peripheral benzodiazepine receptor ligands needs to be confirmed.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDEN, L.A.; DE GROOT, E.R.; SCHAAP, O.R.; LANSDORP, P.M. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. **Eur. J. Immunol.**, **17**: 1411-1413, 1987.
- AKAGI, M. Histamine in the pathogenesis of asthma. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, **111**: 217-222, 1998.
- ALAAEDDINE, N.; DI BATTISTA, J.A.; PELETIER, J.P.; KIANSA, K.; CLOUTIER, J.M.; MARTEL-PELLETIER, J. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. **Arthritis Rheum.**, **42(4)**: 710-718, 1999.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4<sup>th</sup> ed., American Psychiatri Press, Washington, D.C.1994.
- AMICO-ROXAS, M.; CARUSO, A.; LEONE, M.G.; SCIFO, R.; VANELLA, A.; SCAPAGNINI, U. Nerve growth factor inhibits some acute experimental inflammation. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, **299**: 269-285, 1989.
- AMIN, J.; WEISS, D.S GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. **Nature**, **366(6455)**:565-569, 1993.
- AMSTERDAM, A.; SUH, B.S. An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells. **Endocrinol.**, **128**: 503-510, 1991.

- ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MCGARITY, K.L.; BREMER, M.E.; ISAKSON, P.C.; GREGORY, S.A. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX-2) reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin-6 in rat adjuvant arthritis. **J. Clin. Invest.**, **97**: 2672-2679, 1996.
- ANHOLT, R.R.H.; DE SOUZA, E.B.; OSTER-GRANITE, M.L.; SNYDER, S.H.; Peripheral-type benzodiazepine receptors: Autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **233**: 517-526, 1985.
- ANHOLT, R.R.H.; PEDERSEN, E.B.; DE SOUZA, E.B.; SNYDER, S.H. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. **J. Biol. Chem.**, **261**: 576-583, 1986.
- ARCHER, C.B.; PAGE, C.P.; MORLEY, J.; MACDONALD, D.M. Accumulation of inflammatory cells in response to intracutaneous platelet activating factor (PAF-acether) in man. **Br. J. Dermatol.**, **112**: 285-290, 1985.
- AWAD, M. and GAVISH, M. Binding of [3H]Ro5-4864 and [3H]PK 11195 to cerebral cortex and peripheral tissues of various species: species difference and heterogeneity in peripheral benzodiazepine binding sites. **J. Neurochem.**, **49**: 1407-1414, 1987.
- BARNEA, E.R., FARES, F. and GAVISH, M. Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro. **Mol. Cell. Endocrinol.**, **64**: 155-159, 1989.
- BASILE, A.S.; WEISSMAN, B.A. and SKOLNICK P. Maximal electroshock increases the density of [3H]Ro 5-4864 binding to mouse cerebral cortex. **Brain Res. Bull.**, **19**: 1-7, 1987.

- BATHON, J.M.; MANNING, D.C.; GOLDMAN, D.W.; TOWNS, M.C.; PROUD, D.  
Regulation of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **260**: 384-392, 1992.
- BEASLEY, D.; ELDRIDGE, M. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alfa synergistically induced NO synthase in rat vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, **266**: (4 Pt 2): 1197-1203. 1994.
- BENAVIDES, J.; DUBOIS, A.; DENNIS, T.; HAMEL, E. and SCATTON, B. Peripheral type benzodiazepine binding site distribution in the rat immune system: an autoradiographic study with photoaffinity ligand [<sup>3</sup>H]PK 14105. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **249**: 333-339, 1989.
- BENAVIDES, J.; MENAGER, J.; BURGEVIN, M.C.; FERRIS, O.; UZAN, A.; GUÉRÉMY, C.; RENAULT, C.; LE FUR, G. Characterization of solubilized "peripheral-type" benzodiazepines binding sites from rat adrenals by using [<sup>3</sup>H] PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative. **Biochem Pharmacol** **34**: 167-170, 1985.
- BENAVIDES, J.; QUARTERONET, D.; IMBAULT, F.; MALGOURIS, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C. and LE FUR, G. Labeling of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [<sup>3</sup>H]PK 11195, anisoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. **J. Neurochem.**, **41**: 1744-1750, 1983.
- BENAVIDES, J.; QUARTERONET, D.; PLOUIN, P-F.; PHAN, T.; UZAN, A.; RENAULT, C. Characterization of peripheral type benzodiazepine binding sites in human and rat platelets by using [<sup>3</sup>H]PK 11195. Studies in hypertensive patients. **Biochem. Pharmacol.**, **33**: 2467-2472, 1984.

- BERNASSAU, J.M.; REVERSAT, J. L.; FERRARA, P.; CAPUT, D. and LE FUR, G. A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport. **J. Mol. Graphics**, **11**: 236-244, 1993.
- BESMAN M, J.; YANAGIBASHI, K.; LEE, F.D.; KAWAMURA, M.; HALL, P.F. and SHIVELY, J.E. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral-type benzodiazepine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **86**: 4897-4901, 1989.
- BESSLER, H.; WEIZMAN, R.; GAVISH, M.; NOTTI, I.; DJALDETTI, M. Immunomodulatory effect of peripheral benzodiazepine receptor ligands on human mononuclear cells. **J. Neuroimmunol.**, **38**: 19-25, 1992.
- BISHOP-BAILEY, D.; HLA, T.; MITCHELL, J.A. Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. **Int. J. Mol. Med.**, **3(1)**: 41-48, 1999.
- BISHOP-BAILEY, D.; PEPPER, J.R.; LARKIN, S.W.; MITCHELL, J.A. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **18(10)**: 1655-1661, 1998.
- BLACK, K.L.; IKEZAKI, K.; SANTORI, E.; BECKER, D.P. and VINTERS, H.V. Specific high-affinity binding of peripheral benzodiazepine receptor ligands to brain tumors in rat and man. **Cancer**, **65**: 93-97, 1990.
- BONDESSON, L.; NORDLIND, K.; LIDEN, S.; SUNDSTROM, E. Inhibiting effects of serotonin and serotonin antagonists on the migration of mononuclear leucocytes. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, **15 (2-3)**: 243-250, 1993.
- BONUCCELLI, U.; NUT, A.; DEL DOMOTTO, P.; PICCINI, P.; MARTINI, C.; GINANCCINI, G.; LUCACCHINI, A.; MURATORIO, A.; Platelet peripheral

- benzodiazepine receptors are decreased in Parkinson's disease. **Life Sci.** **48**: 1185-1190, 1991.
- BOUTEILLER, C.L.; ASTRUC, R.; MINTY, A.; FERRARA, P.; LUPKER, J.H. Isolation of an IL-13-dependent subclone of the B9 cell line useful for the estimation of human IL-13 bioactivity. **J. Immunol. Methods**, **181**: 29-36, 1995.
- BOVOLIN, P.; SCHLICHTING, J.; MIYATA, M.; FERRARESE, C.; GUIDOTTI, A. and ALHO, H. Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. **Regul. Pept.**, **29**: 267-281, 1990.
- BOWERY, N.G.; PRICE, G.W.; HUDSON, A.L.; HILL, D.R.; WILKIN, G.P. Turnbull MJ. GABA receptor multiplicity. Visualization of different receptor types in the mammalian CNS. **Neuropharmacology**, **23(2B)**: 219-231, 1984.
- BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R.F. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 3805-3809, 1977.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin-gene related peptide and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, **86**: 855-860, 1985.
- BRENNAN, F.M.; GIBBONS, D.L.; MITCHELL, T.; COPE, A.P.; MAINI, R.N. and FELDMANN, M. Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. **Eur. J. Immunol.**, **22**: 1907-1912, 1992.
- BRZEZINSKA-BLASZCZYK, E.; PIETRZAK, A. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates human adenoidal and cutaneous mast cells to histamine secretion. **Immunol. Lett.**, **59**: 139-143, 1997.

- BUEB, J.L.; MOUSLI, M.; BRONNER, C.; ROUTOT, B.; LANDRY, Y. Activation of G<sub>i</sub>-like proteins, a receptor independent effect of kinin in cells. **Mol. Pharmacol.**, **38**: 816-822, 1990.
- BURCH, R.M., CONNOR, J.R.; AXELROD, J. Interleukin-1 amplifies receptor-mediated activation of phospholipase A<sub>2</sub> in 3T3 fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **85**: 6306-6309, 1988.
- BURCH, R.M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A<sub>2</sub>. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **84**: 6374-6378, 1987.
- BURGIN, R.; WEIZMAN, R. and GAVISH, M. Repeated swim stress and peripheral-type benzodiazepine receptors. **Neuropsychobiology**, **33**: 28-31, 1996.
- BUSSOLINO, F.; CAMUSSI, G.; TETTA, C.; GARBARINO, G.; BOSIA, A.; BAGLIONI, C. Selected cytokines promote the synthesis of platelet-activating factor in vascular endothelial cells: comparison between tumor necrosis factor alpha and beta and interleukin-1. **J. Lipid Mediat.**, **2**:15-22, 1990.
- CAMPOS, M.M. Mecanismos envolvidos nas respostas edematogênicas mediadas pela ativação de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas na pata de rato. Departamento de Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina p 1-108, Florianópolis, Brasil, Tese de Mestrado, 1997.
- CAMPOS, R.O.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. **Naunyn. Schmiedebergers Arch. Pharmacol.** **360**: 278-286, 1999.

- CANAT, X.; GUILLAUMONT, A.; BOUABOULA, M.; POINOT-CHAZEL, C.; DEROCQ, J.M.; CARAYON, P.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Peripheral benzodiazepine receptor modulation with phagocyte differentiation. **Biochem. Pharmacol.**, **46**: 551-554, 1993a.
- CAO, T.; PINTER, E.; ALRASHED, S.; GERARD, N.; HOULT, J.R.; BRAIN, S. D. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. **J. Immunol.**, **164**: 5424-5429, 2000.
- COCCHIARA, R.; BONGIOVANNI, A.; ALBEGGIANI, G.; AZZOLINA, A.; GERACI, D. Substance P selectively activates TNF-alpha mRNA in rat uterine immune cells: a neuroimmune link. **Neuroreport.**, **8**: 2961-2964, 1997.
- COLE, A.W.; BROWN, C.E.; MAGEE, C.M.; ROUDEBUSH, R.E.; BRYANT, H.U. Serotonin-induced paw edema in the rat: Pharmacological profile. **Gen. Pharmac.**, **26(2)**: 431-436, 1995.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmac.**, **110**: 193-198, 1993.
- COSTA, E.; GUIDOTTI, A.; MÃO, C.C.; SURIA, A. New concepts on the mechanisms of action of benzodiazepines. **Life Sci.**, **17**: 167-186, 1975.
- DAR, D.E.; WEIZMAN, A.; KARP, L.; GRINSHPOON, A.; BIDDER, M.; KOTLER, M.; TYANO, S. and GAVISH, M. Platelet peripheral benzodiazepine receptors in repeated stress. **Life Sci.**, **48**: 341-346, 1991.
- DE BRITO, F.D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In Liss, A.A.R. (Ed.), *Pharmacological Methods in the control of inflammation*. Degenham: Rhone Poulenc LTD, pp 173-228, 1989.

- DE SOUZA, E.B.; ANHOLT, R.R.; MURPHY, K.M.; SNYDER, S.H. and KUCHAR, M. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenals and testis. **Endocrin.**, **116**: 567-573, 1985.
- DELNESTE, Y.; LASSALLE, P.; JEANNIN, P.; JOSEPH, M.; TONNEL, A.B.; GOSSET, P. Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, **98**: 344-349, 1994.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenin and turpentine. **J. Path.**, **104**: 15-29, 1971.
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, **23**: 297-298, 1971.
- DIANZANI, C.; BRUNELLESCHI, S.; VIANO, I.; FANTOZZI, R. Adenosine modulation of primed human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, **263**: 223-226, 1994.
- DIORI, D.; WENER, S.A.; BUTTERWORTH, R.F.; MEANEY, M.J.; SURANYI-CADOTTE, B.E. Peripheral benzodiazepine binding sites in Alzheimer's disease frontal and temporal cortex. **Neurobiol. Aging.**, **12**: 255-258, 1991.
- DOBLE, A.; FERRIS, O.; BURGEVIN, M.C.; MENAGER, J.; UZAN, A.; DUBROEUCQ, M.C.; RENAULT, C.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. Photoaffinity labeling of peripheral-type benzodiazepine-binding sites. **Mol. Pharmacol.**, **31(1)**: 42-49, 1987.
- DOHERTY N.S.; ROBINSON, B.V. Some biological and pharmacological properties of inflammatory exudates. **J. Pharm. Pharmacol.**, **28(12)**: 859-864, 1976.
- DONNERER, J.; AMANN, R. Inhibition of neurogenic inflammation. **Gen. Pharmacol.**, **24**: 519-529, 1993.

- DRAY, A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurons. **Pain Ver.**, **1**: 153-171, 1994.
- DRUGAN, R.C.; BASILE, A.S.; CRAWLEY, J.N.; PAUL, S.M. and SKOLNICK, P. Inescapable shock reduces [3H]Ro 5-4864 binding to "peripheral-type" benzodiazepine receptors in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **24**:1673-1677, 1986.
- DUBROEUCQ, M.C.; BENAVIDES, J.; DOBLE, A.; GUILLOUX, F.; ALLAM, D.; VAUCHER, N.; BERTRAND, P.; GUEREMY, C.; RENAULT, C.; UZAN, A. and LE FUR, G. Stereoselective inhibition of the binding of [3H]PK 11195 to peripheral-type benzodiazepine binding sites by a quinolinepropanamide derivative. **Eur. J. Pharmacol.**, **128**: 269-272, 1986.
- ENDO, T.; OGUSHI, F. E SABURO, S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down regulated by IL-13, but not by IFN- $\gamma$ . **J. Immunol.**, **156**: 2240-2246, 1996.
- EVANS-SHIELDS, J.M. and LAIRD, H.E. Mitogenically-induced alteration of peripheral-type ( $\tau$ ) receptor density on the NB2-11C cell clone. **Soc. Neurosci.**, **17**: 1555 (Abstract), 1991.
- FARES, F.; BAR-AMI, S.; BRANDES, J.M.; GAVISH, M. Gonadotrophin and estrogen-induced increase of . 1987; peripheral-type benzodiazepine binding sites in the hypoly-genital axis of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **133**: 97-102, 1987.
- FARGES, R.; JOSEPH-LIAUZUN, E.; SHIRE, D.; CAPUT, D.; LE FUR, G.; LOISON, G.; FERRARA, P. Molecular basis for the different binding properties of benzodiazepines to human and bovine peripheral-type benzodiazepine receptors. **FEBS Lett.**, **335**: 305-308, 1993.

- FARGES, R.; JOSEPH-LIAUZUN, E.; SHIRE, D.; CAPUT, D.; LE FUR, G.; FERRARA, P. Site-directed mutagenesis of the peripheral benzodiazepine receptor: identification of amino acids implicated in the binding site of Ro5-4864. **Mol. Pharmacol.**, **46**: 1160-1167, 1994.
- FERRARESE C.; MENNINI, T.; PECORA, N.; PIERPAOLI, C.; FRIGO, M.; MARZORATI, C.; GOBBI, M.; BIZZI, A.; CODEGONI, A.; GARATTINI, S. and FRATTOLA, L. Diazepam binding inhibitor (DBI) increase after acute stress in rat. **Neuropharmacology**, **30**: 1145-1152, 1991.
- FERRARESE, C.; APPOLLONIO, J.; FRIGO, M.; GAINI, S.M.; PIOLTI, R. and FRATTOLA, I. Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral tumors. **Ann. Neurol.**, **26**: 564-568, 1989.
- FERRARESE, C.; APPOLLONIO, I.; FRIGO, M.; PIOLTI, R.; TRABUCCHI, M.; FRATTOLA, L. Decreased density of benzodiazepine receptors in lymphocytes of anxious patients: reversal after chronic diazepam treatment. **Acta Psychiatr. Scand.** **82**: 169-173, 1990.
- FILEP, J.G.; DELANDRE, A.; PAYETTE, Y.; FOLDES-FILEP E. Glicocorticoide receptor regulate expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. **Circulation**, **96(1)**: 295-301, 1997.
- FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERSICO, P.; SALMON, J.A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomized and sham-operated rats. **Br. J. Pharmacol.**, **87**: 57-62, 1989.
- FORSTERMANN, U.; POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.W.; HELLER, M.E.; MURAD, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor nitric oxide synthetase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 1788-1792, 1991.

- FRENCH, J.F.; MATLIB, M.A. Identification of a high-affinity peripheral-type benzodiazepine binding site in rat aortic smooth muscle membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **247**: 23-28, 1988.
- FUSHIMI, T.; OKAYAMA, H.; SHIMURA, S.; SAITOH, H.; SHIRATO, K. Dexamethasone suppresses gene expression and production of IL-13 by human mast cell line and lung mast cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **102**: 134-142, 1998.
- GARNIER, M.; DIMCHEV, A.; BOUJRAD, N.; PRICE, M. J.; MUSTO, N.A. and PAPADOPOULOS, V. In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. **Mol. Pharmacol.**, **45**: 201-211, 1994.
- GAY, J.C.; BECKMAN, J.K.; ZABOY, K.A.; LUKENS, J.N. Modulation of neutrophil oxidative responses to soluble stimuli by platelet-activating factor. **Blood**, **67**: 931-936, 1986.
- GEHLERT, H.I.; YAMAMURA, H.I.; WAMSLEY, J.K. Autoradiographic localization of "peripheral" benzodiazepine binding sites in the rat brain and kidney using [3H]RO5-4864. **Eur. J. Pharmacol.**, **95**: 329-330, 1983.
- GILLIGAN, J.P.; LOVATO, S.J.; ERION, M.D.; JENG, A.Y. Modulation of carrageenan hind paw oedema by substance P. **Inflammation**, **18**: 285-292, 1994.
- GIRARD, D.; PAQUIN, R.; NACCACHE, P.H.; BEAULIEU, A.D. Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. **J. Leukoc. Biol.**, **59** (3): 412-421. 1996.

- GLATT, M.; DIEPPE, P.; WILLOUGHBY, D. Crystal-induced inflammation, enzyme release and the effects of drugs in the rat pleural space. **J. Rheumatol.**, **6(3)**: 251-258, 1979.
- GOLDENBERG, M.M.; MEURER, R.D. A pharmacologic analysis of the action of platelet-activating factor in the induction of hindpaw oedema in the rat. **Prostaglandins**, **28**: 271-278, 1984.
- GUIDOTTI, A.; FORCHETTI, C.M.; CORDA, M.G.; KONKEL, D.; BENNET, C.D. and COSTA, E. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**: 3531-3533, 1983.
- GUIDOTTI, A.; TOFFANO, G. and COSTA, E. An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. **Nature**, **257**: 533-535, 1978.
- GUTIERREZ, S.; PALACIOS, I.; EGIDO, J.; ZARCO, P.; MÍGUELEZ, R.; GONZALEZ, E.; HERRERO-BEAUMONT, G. IL-1 beta and IL-6 stimulate the production of platelet-activating factor (PAF) by cultured rabbit synovial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, **99(3)**: 364-368, 1995.
- HANCOCK, A.; ARMSTRONG, L.; GAMA, R.; MILLAR, A. Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, **18**: 60-65, 1998.
- HARDWICK, M.; FERTIKH, D.; CULTY, M.; LI, H.; VIDIC, B.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: Correlation of breast cancer aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. **Cancer Res.**, **59**: 831-842, 1999.

- HARTÜNG, H.P.; WOLTERS, K.; TOYKA, K.V. Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. **J Immunol.**, **136(10)**: 3856-3863, 1986.
- HENRIQUES, M.G.; WEG, V.B.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.R.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGAFITIC, B.B. Differential inhibition by two hexapeptide PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **99** :164-168, 1990.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J. and CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brasilian J. Med. Biol. Res.**, **20**: 243-249, 1987.
- HINSON, R.M.; WILLIAM, J.A.; SHACTER, E. Elevated interleukin 6 induced by prostaglandin E<sub>2</sub> in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase **Proc. Natl. Aca. Sci.**, **293**: 4885-4890, 1996.
- HOLSAPPLE, M.P.; SCHUNUR, M. and YIM, J.K.M. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin, and histamine . **Agents Actions**, **10**: 368-373, 1980.
- HORAKOVA, Z.; BAYER, B.M.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Evidence that histamine does not participate in carrageenan-induced pleurisy in rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **62**: 17-25, 1980.
- HURLEY, J.V. Endogenous chemical mediators of inflammation. In: Acute inflammation, 2<sup>nd</sup> edn, Churchill Livingstone, London, pp. 102-108, 1983.
- HWANG, S.B.; LAM, M.H.; LI, C.L.; SHEN, T.Y. Release of platelet activating factor and its involvement in the first phase of carrageenan-induced rat foot oedema. **Eur. J. Pharmacol.**, **120**: 33-41, 1986.

- IALENTI, A.A.; IANARO, S.; MONCADA, S. and DI ROSA, M. Modulation of agude inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, **211**: 177, 1992.
- IGNARRO, L.J. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. **Blood Vessels**, **28**: 67-73, 1991.
- IKEZAKI, K. and BLACK, K.L. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepines. **Cancer Lett.**, **49**: 115-120, 1990.
- ISHIZU, A.; ISHIKURA, H.; NAKAMURA, Y.; TAKEUCHI, E.; KIMURA, C.; KOIKE, T.; YOSHIKI, T. Thy-1 induced on rat endothelium regulates vascular permeability at the sites of inflammation. **Int. Immunol.**, **7**: 1939-1947, 1995.
- JENKINSON, E.J.; PARNELL, S.; SHUTTLEWORTH, J.; OWEN, J.J.; ANDESSON, G. Specialized ability of thymic epithelial cells to mediate positive selection does not require expression of the steroidogenic enzyme p450scc. **J. Immunol.**, **163**: 5781- 5785, 1999.
- JOHNSON, M.R. and LYDIARD, R.B. The neurobiology of anxiety disorders. **Psychiatr. Clin. North. Am.**, **18**: 681-725, 1995.
- KARP, L.; WEIZMAN, A.; TYANO, S. and GAVISH, M. Examination stress, platelet peripheral benzodiazepine binding sites, and plasma hormone levels. **Life Sci.**, **44**: 1077-1082, 1989.
- KATORI, M.; HARADA, Y.; TANAKA, K.; MIYAZAKI, H.; ISHIBASHI, M.; YAMASHITA, Y. Changes of prostaglandin and thromboxane levels in pleural fluid of rat carrageenin-induced pleurisy. **Adv. Prostaglandin. Thromboxane Res.**, **8**: 1733-1737, 1980.
- KATZ, L.B.; THEOBALD, H.M.; BOOKSTAFF, R.C.; PETERSON, R.E. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and

- dextran in 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. **J. Pharmacol Exp Ther**, **230 (3)**: 670-677, 1984.
- KATZ, Y.; BEN-BARUCH, G.; KLLOG, Y.; MCNCZER, J. and GAVISH, M. Increased density of peripheral benzodiazepine-binding sites in ovarian carcinomas as compared with benign ovarian tumours and normal ovaries. **Clinical Sci.**, **78**: 155-158, 1990b.
- KATZ, Y.; EITAN, A.; GAVISH, M. Increase in peripheral benzodiazepine binding sites in colonic adenocarcinoma. **Oncology.**, **47(2)**: 139-142. 1990c.
- KRUEGER, K.E. and PAPADOPOULOS. V. Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **32**: 211-237, 1992.
- KRUEGER, K.E. and PAPADOPOULOS. V. Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroids biosynthesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, **32**: 211-237, 1990.
- KRUEGER, K.E. Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors. **Biochim. Biophys. Acta.**, **1241**: 453-470, 1995.
- LABERGE, S.; CRUIKSHANK, W.W.; BEER, D.J.; CENTER, D.M. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. **J. Immunol.**, **156 (1)**: 310-315, 1996.
- LACASSE, C.; TURCOTTE, S.; GINGRAN, D.; STANKOVA, J.; ROLAPLESZCZYNSKI, M. Platelet-activating factor stimulates interleukin-6 production by human endothelial cells and synergizes with tumor necrosis factor for enhanced production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Inflammation**, **21**: 145-158, 1997.

- LACOR, P.; GANDOLFO, P.; TONON, M-C.; BRAULT, E.; DALIBERT, I.; SCHUMACHER, M.; BENAVIDES, J. and FERRAZ, B. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: A role for PBR in neurosteroidogenesis. **Brain Res.**, **815**: 70-80, 1999.
- LAMBERT, N.; LESCOULIE, P.L.; YASSINE-DIAB, B.; ENAULT, G.; MAZIERES, B.; DE PREVAL, C.; CANTAGREL, A. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, **113**: 269-275, 1998.
- LE FUR, G.; PERRIER, M.L.; VAUCHER, N.; IMBAULT, F.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. In vitro studies. **Life Sci.**, **32**: 1839-47, 1983.
- LE FUR, G.; VAUCHER, N.; PERRIER, M.L.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; UZAN, A. Differentiation between two different ligands for peripheral benzodiazepine binding sites: [<sup>3</sup>H] Ro5-4864 and [<sup>3</sup>H] PK 11195 by thermodynamic studies. **Life Sci.**, **33**: 449-447, 1983a.
- LEE, K.M.; TOSCAS, K.; VILEREAL, M.L. Inhibition of bradykinin and thapsigargin-induced Ca<sup>+2</sup> entry by tyrosine kinase inhibitors. **J. Biol. Chem.**, **268**: 9945-9948, 1993.
- LIAUZUN, E.J.; FARGES, R.; DELMAS, P.; FERRARA, P.; LOISON, G. The Mr 18,000 subunit of the peripheral-type benzodiazepine receptor exhibits both benzodiazepine and isoquinoline carboxamide binding sites in the absence of the

- voltage-dependent anion channel or of the adenine nucleotide carrier. **J. Biol. Chem.**, **272(44)**: 28102-28106. 1997.
- LUEDDENS, H.W.M.; NEWMAN, A.H.; RICE, K.C.; SKOLNICK, P. AHN 086: an irreversible ligand of "peripheral" benzodiazepine receptors. **Mol. Pharmacol.**, **29(6)**: 540-545. 1986.
- MACDONALD, R.L.; SAXENA, N.C.; ANGELOTTI, T.P. Functional expression of recombinant GABAA receptor channels in L929 fibroblasts. **Epilepsy Res. Suppl.**, **12**: 177-185, 1996.
- MAGGI, C.A.; The mammalian tachykinin receptors. **Gen. Pharmacol.**, **26**: 911-944, 1995.
- MAMALAKI, C.; STEPHENSON, F.A.; BARNARD, E.A. The GABAA/benzodiazepine receptor is a heterotetramer of homologous alpha and beta subunits. **EMBO J.** **6(3)**: 561-565, 1987.
- MARANGOS, P.J.; PATEL, J.; BOULENGER, J.P.; CLARK-ROSENBERG. Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [3H]Ro 5-4864. **Mol. Pharmacol.**, **22** : 26-32, 1982.
- MARRAZZITI, D.; ROTONDO, A.; MARTINI, C.; GIANNACCINI, G.; LUCACCHINI, A.; PANCIOLI-GUADAGNUCCI, M.L.; DIAMOND, B.I.; BORISON, R.; CASSANO, G.B. Change in peripheral benzodiazepine receptors in patients with panic disorder and obsessive compulsive disorder. **Neuropsychobiology**, **29**: 8-11, 1994.
- MARUO, N.; MORITA, I.; SHIRATO, M.; MUROTA, S.; IL-6 increases endothelial permeability in vitro. **Endocrinology**, **131**: 710-714, 1992.

- McENERY, M.W. The Mitochondrial benzodiazepine receptors: evidence for association with the voltage-dependent anion channel. **J. Bioenerg. Biomembr.** **24**: 63-69, 1992.
- McENERY, MW.; TRIFILETTI, R.R.; SNIDER, S.H. Isolation of the Mitochondrial benzodiazepine receptors: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89** : 3170-3174, 1992.
- MERTZ, P.M.; DEWITT, D.L.; STETLER-STEVENSON, W.G. and WAHL, L.M. Interleukin-10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. **J. Biol. Chem.**, **269**: 21322-21329, 1994.
- MIANJI, S.; HAMASAKI, Y.; YAMAMOTO, S.; MIYAZAKI, S. Inhibition by dexamethasone of the lipopolysaccharide-induced increase in IL-6 mRNA abundance and IL-6 production in human polymorphonuclear leukocytes. **Int. J. Immunopharmacol.**, **18**: 39-346, 1996
- MIKAMI, T.; MIYASAKA, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy **Eur. J. Pharmacol.**, **95(1-2)**: 1-12, 1983.
- MIKI, I.; KUSANO, A.; OHTO, S.; HANAI, N.; OTOSHI, M.; MASAKI, S.; SATO, S.; OHMORI, K.; Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM on vascular endothelial cells. **Cell Immunol.**, **171**: 285-288, 1996.
- MODEER, T.; ANDUREN, I.; YUCEL-LINDEBERG, T. Bradykinin synergistically stimulates interleukin 6 production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin 1 or tumor necrosis factor alpha. **Cytokine**, **10**: 26-31, 1998.

- MOHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; LUSCHER, B.; RUDOLPH, U.; BENSON, J.; BENKE, D. The GABAA receptors. From subunits to diverse functions. **Ion Channels**, **4**: 89-113, 1996.
- MOINGEON, P.H.; BIDART, J.M.; ALBERICI, C.; BOHUON, C. Characterization of a peripheral-type benzodiazepine binding site on human circulating lymphocytes. **Eur J. Pharmacol.**, **92**: 147-149, 1983.
- MONCADA, S. and HIGGIS, A. L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, **329**: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. and HIGGIS, E.A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-141, 1991.
- MORENO-SÁNCHEZ, R.; HOGUE, B.A.; BRAVO, C.; NEWMAN, A.H.; BASILE, A.S. and CHIANG, P.K. Inhibition of substrate oxidation in mitochondria by the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand ANH 086. **Biochem. Pharmacol.**, **41**:1479-1484, 1991.
- MOSSNER, R.; HEILS, A.; STOBER, G.; OKLADNOVA, O.; DANIEL, S.; LESCH, K.P. Enhancement of 5-HT transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. **Neurochem. Int.**, **3** : 251-254, 1998.
- MUKHIN, A.G.; PAPADOPOULOS, V.; COSTA, E. and KRUEGER, K.E. Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 9813-9816, 1989.
- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Abr. Aj. APharmacol.**, **128**: 853-859, 1999.

- NOVAS, M.L.; MEDINA, J.H.; CALVO and DE ROBERTIS, E. Increase of peripheral-type benzodiazepine binding sites in kidney and olfactory bulb in acutely stressed rats. **Eur. J. Pharmac.**, **135**: 243-246, 1987.
- OH-ISHI, S. Analysis of chemical mediators involved in acute inflammatory reaction with the rat pleurisy model. **Nippon Yakurigaku Zasshi.**, **110**: 59-68, 1997.
- OH-ISHI, S.; HAYASHI, I.; HAYASHI, M.; YAMAKI, K.; UTSUNOMIYA, I. Pharmacological demonstration of inflammatory mediators using experimental inflammatory models: rat pleurisy induced by carrageenin and phorbol myristate acetate. **Dermatologica**, **179**: 68-71, 1989.
- ÖHLEN, A.; THURESSON-KLEIN, A.; LINDIBOM; PERSON, M.G.; HEDQVIST, P. Substance P activates leucocytes and platelets in rabbit microvessels. **Blood vessels**, **26**: 84-94, 1989.
- OLSON, J.M.M. ; CILIAX, B.J. ; MANCINI, W.R. ; YOUNG, A.B. Presence of peripheral-type benzodiazepine binding sites on human erythrocyte membranes. **Eur. J. Pharmacol.**, **152**: 47-53, 1988
- ORINO, E.; SONE, S.; Nil, A. and OGURA T. IL-4 up-regulates IL-1 receptor antagonist gene expression and its production in human blood monocytes. **J. Immunol.**, **149**: 925-931, 1992.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter function of mammalian Tachykinins. **Am. Soc. Physiol. Rev.**, **73**: 229-307, 1993.
- OWEN, F.; POUTER, M.; WADDINGTON, J.L.; MASHAL, R.D.; CROW, T.J. [<sup>3</sup>H] Ro5-4864 and [<sup>3</sup>H] flunitrazepan binding in kainate-lesioned rat striatum and in temporal cortex of brains from patients with senile dementia of the Alzheimer type. **Brain Res.**, **278**: 373-375, 1983.

- OYANAGUI, Y. Anti-inflammatory effects of polyamines in serotonin and carrageenan paw edemata- possible mechanisms to increase vascular permeability inhibitory protein level which is regulated by glucocorticoides and superoxide radical. **Agents Actions**, **14**: 28-237, 1984.
- PAEGELOW, I.; WERMER, H.; REISMANN, S.; Effects of bradykinin and bradykinin analogues on spleen cells of mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **279**: 211-216, 1995.
- PAPADOPOULOS, V.; GUARNERI, P.; KREUGER, K.E.; GUIDOTTI, A. and COSTA, E. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: Regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 5113-5117, 1992.
- PAPADOPOULOS, V.; MUKHIN, A.G.; COSTA, E. and KRUEGER, K.E. The peripheral-type benzodiazepinereceptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. **J. Biol. Chem.**, **265**: 3772-3779, 1990.
- PAROLA, A.L.; STUMP, D.G.; PEPPERL, D.J.; KRUEGER, K.E.; REGAN, J.W. and LAIRD, H.E., II. Cloning and expression of a pharmacologically unique bovine peripheral-type benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein. **J. Biol. Chem.**, **266**: 14082-14087, 1991.
- PAROLA, A.L.; YAMAMURA, H.I.; LAIRD, H.E. Peripheral-type benzodiazepine receptors. **Life Sci.**, **52** : 1329-1342, 1993.
- PAWLIKOWSKI, M.; LYSON, K.; KUMERT-RADIEK, J. and STEPIEN. H. Effects of benzodiazepines on the proliferation of mouse spleen lymphocytes. **J. Neurol. Transm.**, **73**: 161-166, 1988.
- PETERS, R.R. Avaliação das atividades antinociceptivas e antiinflamatórias de extrato, frações, sub-frações e compostos isolados de *Wilbrandia ebracteata*

- Cogn. Departamento de Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina p 1-129, Florianópolis, Brasil, Tese de Mestrado, 1997.
- POLOSA, R.; DJUKANOVISC, R.; RAJAKULASINGAM, K.; PALERMO, F.; HOLGATE, S.T. Skin responses to bradykinin, kailidin, and des-Arg<sup>9</sup> bradykinin in nonatopic and atopic volunteers. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **92**: 683-689, 1993.
- PORTANOVA, J.P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; GREGORY, A.S.; ISAKSON, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.**, **184**: 883-891, 1996.
- PREVAL, C.; CANTAGRELM, A. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, **113**: 269-275, 1998.
- RAGHAVENDRA; RAO, V.L.; DOGAN, A.; BOWEN, K.K.; DEMPSEY, R.J. Traumatic Brain Injury Leads to Increased Expression of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptors, Neuronal Death, and Activation of Astrocytes and Microglia in Rat Thalamus. **Exp. Neurol.**, **161**: 102-114, 2000.
- RAGO, L.; ADOJAAN, A. and POKK, P. The effect of stress on  $w_3$  benzodiazepine receptor in rat blood platelets and lymphocytes: The effect of non-benzodiazepine tranquilizers, in *Molecular Pharmacology of Receptors*, Vol 3 (allikments LH ed pp 4-16), Tartu University Press, Tartu, Estonia, 1989a.
- RAGO, L.; KIIVET, R-A.; HARRO, G. and POLD, M. Central- and peripheral-type benzodiazepine receptors: Similar regulation by stress and GABA receptor agonists. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **32**: 879-883, 1989b.
- RAYCHAUDHURI, A.; CHERTOCK, H.; CHOVAN, J.; JONES, L.S.; KIMBLE, E.F.; KOWALSKI, T.J.; PEPPARD, J.; WHITE, D.H.; SATOH, Y.; ROLAND, D.

- Inhibition of LTB<sub>4</sub> biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** **355(4):** 470-474, 1997.
- REGAN, J.W.; ROESKE, W.R.; MALICK, J.B.; YAMAMURA, S.H.; and YAMAMURA, H.I. GABA enhancement or CL 218, 872 affinity and evidence of benzodiazepine receptor heterogeneity. **Mol. Pharmacol.**, **20:** 477, 1981.
- REGLIER, H.; ARCE-VICIOSO, M.; FAY, M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; CHOLLET-MARTIN, S. Lack of IL-10 and IL-13 production by human polymorphonuclear neutrophils. **Cytokine**, **10:** 192-198, 1998.
- RICCIARDOLO, F.M.; NADEL, J.A.; GRAF, P.D.; BERTRAND, C.; YOSHIHARA, S.; GEPPETTI, P. Role of kinins in anaphylactic-induced bronchoconstriction mediated by tachykinins in guinea-pigs. **Br. J. Pharmacol.**, **113:** 508-512, 1994.
- RIOND, J.; MATTEI, M.G.; KAGHAD, M.; DUMONT, X.; GUILLEMONT, J.C.; LE FUR, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P. Molecular cloning and chromosomal location of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. **Eur. J. Biochem.**, **195:** 305-311, 1991a.
- ROCCA, P.; FERRERO, P.; GUALERZI, A.; ZANALDA, E.; MAINA, G.; BERGAMASCO, B.; RAVIZZA, L.P. Peripheral-type benzodiazepine receptors in anxiety disorders. **Acta Psychiatr. Scand**, **84:** 537-544, 1991.
- ROMEO, E.; AUTA, J.; KOZILOWSKI, A.; MA, A.; PAPADOPOULOS, V.; PUJA, G.; COSTA, E. and GUIDOTTI, A. 2 ARYL-3- indoleacetamides (FGIN-1): a new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, **262:** 971-978, 1992.

- RUFF, M.R.; PERT, C.B.; WEBER, R.J.; WAHL, S.M.; WAHL, L.M.; PAUL, D. Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. **Sci.**, **229**: 1281-1283, 1985.
- SAAD, B.; FREI, K.; SCHOLL, F.A.; FONTANA, A.; MAIER, P. Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor alfa mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. **Eur. J. Biochem.**, **229 (2)**: 349-355, 1995.
- SABAN, M.R.; SABAN, R.; BJORLING, D.; HAAK-FRENDSCHO, M. Kinetics of peptide-induced release of inflammatory mediators by the urinary bladder. **Br. J. Urol.**, **80**: 742-747, 1997.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B. and MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, **118**: 811-819, 1996.
- SALEH, T.S.F.; VIANNA, R.M.J.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CHACRAVARTY, B.J.M.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. Oral-anti-inflammatory action of NPC18884, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, **363**: 179-187, 1998.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , **90 (15)**: 7240-7244. 1993.
- SALVEMINI, D.; SEIBERT, K.; MASFERRER, J.L.; MISKO, T.P.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. Endogenous nitric oxid enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. **J. Clin. Invest.**, **93**: 1940-1947, 1994.
- SALVEMINI, D.; Wang, Z.; Wyatt, P.S.; Bourdon, D.M.; Marino, M.H.; Maningg, P.T. & Currie, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of

- carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, **118**: 829-838, 1996.
- SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenan rat paw oedema. **Eur. J. Pharmacol.**, **286**: 219-222, 1995.
- SCHOEMAKER, H.; BOLES, R.G.; HORST, W.D.; YAMAMURA, H.I. Specific high-affinity binding sites for [3H]Ro 5-4864 in rat brain and kidney. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **225**: 61-69, 1983.
- SCHOEMAKER, H.; M. BLISS.; YAMAMURA, S. and YAMAMURA, H. High affinity benzodiazepine binding sites for [3 H]Ro 5-4864 in the rat cerebral cortex. **European J. Pharmacol.**, **71**: 173, 1981.
- SCHROTH, M. Adhesion molecules in asthma and allergy. **Mol. Biol. Allergy Immunol.**, **16**: 643-657, 1996.
- SCOTT, D.T.; LAM, F.Y. e FERREL, W.R. Acute joint inflammation: mechanisms and mediators. **Gen. Pharmacol.**, **25(7)**: 1285-1296, 1994.
- SIEGHART, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. **Pharmacol. Rev.**, **47(2)**: 181-234, 1995
- SIGEL, E.; BAUR, R.; KELLENBERGER, S.; MALHERBE, P. Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABAA receptor channels. **EMBO J.**, **11(6)**: 2017-2023, 1992.
- SLOBODYANSKY, E.; GUIDOTTI, A.; WAMBEBE, C.; BERKOVICH, A.; COSTA, E. Isolation and characterization of a rat brain triakontatetrapeptide, a post-translational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro5-4864 recognition site. **J. Neurochem.**, **53**: 1276-1284, 1989.

- SMITH, G.B.; OLSEN, R.W. Identification of a [3H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acidA receptor alpha subunit. **J. Biol. Chem.**, **269(32)**: 20380-29387, 1994.
- SNYDER, S.H.; VERMA, A. and TRIFILETTI, R.R. The peripheral-type benzodiazepine receptor; a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. **FASEB J.** **1**: 282-288, 1987.
- SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **J. Pathol. Bact.**, **72**: 367-380, 1956,
- SPERTINI, O.; LUCINSKAS, F.M.; KANSAS, G.S.; MUNRO, J.M.; GRIFFIN, J.D.; GIMBRONE, M.A.; TEDDA, T.F. 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.
- SPRENGEL, R.; WERNWER, P.; SEEBURG, P.H.; MUKHIN, A.G.; SANTI, M.R.; GRAYSON, D.R.; GUIDOTTI, A.; KRUEGUER, K.E. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. **J. Biol. Chem.**, **264**: 20415-20421, 1989.
- SQUIRES, R. F., BRAESTRUP, C. Benzodiazepine receptors in rat brain. **Nature**, **266**: 732-734, 1977.
- STAROSTA-RUBINSTEIN, S.; CILIAUX, B.J.; PENNEY, J.B.; McKEEVER, P. and YOUNG, A.B. Imaging of a glioma using peripheral benzodiazepine receptor ligands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 891-895, 1987.
- STERNER-KOCK, A.; BRAUN, R.K.; SCHRENZEL, M.D.; HYDE, D.M. Recombinant tumour necrosis factor-alpha and platelet-activating factor synergistically increase intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin-dependent neutrophil adherence to endothelium *in vitro*. **Immunology**, **87**: 454-460, 1996.

- SUFKA, K.J.; SCHOMBURG, F.M.; GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT induced inflammation and nociception in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, **41**: 53-56, 1991.
- SUGIMOTO, Y.; TARUMI, T.; ZHAO, Q.E.; FUJII, Y.; KAMEI, C. Effects of antiallergic drugs on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by bradykinin. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, **29 (6)**: 457-462, 1998.
- SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J. Pharmacobiodyn.**, **4**: 565-575, 1981.
- TAKEDA, Y.; MIYAMORII.; YONEDA, T.; IKI, K.; HATAKEYAMA, H.; BLAIR, I.A.; HSIEH, F.Y.; TAKEDA, R. Synthesis of corticosterone in the vascular wall. **Endocrinology**, **135**: 2283-2286, 1994.
- TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.; SPECTOR, S. [<sup>3</sup>H] Diazepam binding sites on rat heart and kidney. **Biochem. Pharmacol.**, **31**: 589, 1982.
- TIFFANY, C.W.; BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and Interleukin-1 release from macrophages, **Febs. Lett.**, **247**: 189-192, 1989.
- TRATSK, R.S.; CAMPOS, M.M.; VAZ, Z.R.; FILHO, V.C.; SCHLEMPER, V.; YUNES R.A. and CALIXTO, J.B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *drymis winteri*, **Inflammation Research**, **46**: 509-514, 1997.
- TSANKOVA, V; MAGISTRELLI A, CANTONI L and TACCONI MT, Peripheral benzodiazepine ligands in rat liver mitochondria: Effect on cholesterol metabolism. **Eur. J. Pharmacol.**, **294**: 601-607, 1995.
- UENO, A; NARABA, H., IKEDA, Y., USHIKUBI, F., MURATA, T., NARUMIYA, S., OH-ISHI, S. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin

- or carrageenin: a study on the paw oedema induced in IP-receptor-deficient mice. **Life Sci.** **66** : 155-160, 2000.
- 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.
- VERMA, A. and SNYDER, S.H. Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepines receptors. **Mol. Pharmacol.**, **34**: 800-805, 1988.
- VERMA, A. and SNYDER, S.H. Peripheral type benzodiazepine receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **29**: 307-322, 1989.
- VIANNA, R.M.; CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-bk in mouse pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, **123(2)**: 281-291, 1998.
- VINEGAR, R.; SCHREIBER, W. and HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **166**: 284-290, 1969.
- WALZOG, B.; SCHAFFETTER-KOCHANNEK, K.; GAEHTGENS, P. Impairment of neutrophils emigration in CD-18-nul mice. **Am. Physiol. Soc.**, **276**: 1125-1130, 1999.
- WANG J.K.T.; MORGAN, J.I. and SPECTOR, S. Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**:753-756, 1984.
- WANG, J.K.T.; TANIGUCHI, T. and SPECTOR, S. Properties of [3H]-diazepam binding sites on rat blood platelets, **Life Sci.**, **27**: 1881, 1980.

- WEIZMAN, A.; BIDDER, M.; FARES, F. and GAVISH, M. Food deprivation modulates  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors and peripheral benzodiazepine binding sites in rats. **Brain Res.**, **535**: 96-100, 1990.
- WEIZMAN, R.; TANE, Z.; GRANEK, M.; KARP, L.; GOLOMB, M.; TYANO, S. and GAVISH, M. Peripheral benzodiazepine binding sites on platelet membranes are increased during diazepam treatment of anxious patients. **Eur. J. Pharmacol.**, **138**: 289-292, 1987b.
- WHALLEY, E.T.; SAMPAIO, C.A.; FRITZ, H.; EDWARDS, G. The effect of kinins on paw oedema and uterus in rats. **Naunyn Schmeidebergs Arch. Pharmacol. Dec.**, **328 (2)**: 202-206, 1984.
- YANAGIBASHI, K.; OHNO, Y.; NAKAMICHI, N.; MATSUI, T.; HAYASHIDA, K.; TAKAMURA, M.; YAMADA, K.; TOU, S. and KAWAMURA, M. Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. **J. Biochem.**, **106**: 1026-1029, 1989.
- YU, C.L.; HUANG, M.H.; KUNG, Y.Y.; TSAI, C.Y.; TSAI, S.T.; HUANG, D.F.; SUN, K.H.; HAN, S.H.; YU, H.S. Interleukin -13 increases prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. **Inflammation Res.**, **47**: 167-173, 1998.
- ZAVALA, F.; LENFANT, M. Peripheral benzodiazepines enhance the respiratory burst of macrophage-like P388D1 cells stimulated by arachidonic acid. **Int. J. Immunopharmacol.**, **9**: 269-74, 1987.
- ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; LENFANT, M. Interactions of benzodiazepines with mouse macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, **106**: 561-6, 1985.

- ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; LENFANT, M. Interactions of benzodiazepines with mouse macrophages. **Eur. J. Pharmac.**, **106**: 561-566, 1984.
- ZAVALA, F.; MASSON, A.; BRYNS, L.; DE BAETSELIER, P. and DESCAMPS-LATSHA, B. A monoclonal antibody against peripheral benzodiazepine receptor activates the human neutrophil NADPH-oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **176**: 1577-1583, 1991.
- ZAVALA, F.; TAUPIN, V.; DESCHAMPS-LATSCHA, B. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin-6. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **255**: 442-450, 1990a.
- ZAVALA, F.; VEBER, F. and DESCAMPS-LATSCHA, B. Altered expression of neutrophil peripheral benzodiazepine receptor in X-linked chronic granulomatous disease. **Blood**, **76**: 184-188, 1990b.
- ZAVALA, F.; VEBER, F.; TAUPIN, V.; NGUYEN, A.T.; DESCHAMPS-LATSCHA, B. Reconstitution of peripheral benzodiazepine receptor expression in X-linked chronic granulomatous disease by interferon-gamma. **Lancet.**, **336(8717)**: 758-759, 1990c.
- ZHU, Z.; HOMER, R.J.; WANG, Z.; CHEN, Q.; GEBA, G.P.; WANG, J.; ZHANG, Y. and ELIAS, J.A. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **J. Clin. Invest.**, **103(6)**: 779-788, 1999.
- ZIMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, **16**: 109-110, 1983.
- ZISTERER, D.M.; GORMAN, A.M.C.; WILLIAMS, D.C.; MURPHY, M.P. The effects of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands, Ro5 4864 and PK 11195, on

mitochondrial respiration. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, 14: 85-90, 1992.

ZITNIK, R.J.; WHITING, N.L.; ELIAS, J.A. Glucocorticoid inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts: evidence for transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 10: 643-650, 1994.