

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
DOUTORADO EM FARMÁCIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ANÁLISES CLÍNICAS**

EDUARDO MONGUILHOTT DALMARCO

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DO MICOFENOLATO DE MOFETILA
NO MODELO DE PLEURISIA INDUZIDA PELA
CARRAGENINA, EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Tânia Silvia Frode
Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

**FLORIANÓPOLIS
2010**

D148e

Dalmarco, Eduardo Monguilhott

Estudo dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante do Micofenolato de mofetila no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos [tese] / Eduardo Monguilhott Dalmarco ; orientadora, Tânia Silva Frode. – Florianópolis, SC, 2011.

139 p. : graf.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Agentes antiinflamatórios. 3. Pleurisia. 4. Camundogo. I. Frode, Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Dedico esta tese aos meus queridos pais Euclides e Sônia. O muito obrigado seria insuficiente para expressar tudo que sinto neste momento, principalmente a você, meu pai, que acreditou no meu sonho desde o início e nunca sequer pestanejou, sempre com a certeza que a minha escolha era a acertada. Hoje sou o que sou, graças ao que vocês me ensinaram. Aprendi com vocês que mesmo frente aos dolorosos obstáculos enfrentados, nunca devemos desistir, e que acima de tudo devemos sempre acreditar no amanhã. A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me guiou pelo caminho do sucesso e de realizações, mesmo que muitas vezes este caminho tenha parecido sinuoso;

Aos meus pais, irmãos, avós, minha gratidão eterna pelo carinho e incentivo que sempre me confortaram, nestes quase quatro anos de luta;

À Juliana, minha esposa, por suportar muitas vezes meu mau humor durante este período e por demonstrar que o amor puro e verdadeiro existe e o quanto ele é importante em nossas vidas, eu te amo;

À minha orientadora, Profª. Dra. Tânia Silvia Fröde, por sua confiança em mim depositada, bem como pela sua atenção, preocupação e amizade dispensadas desde o início das minhas atividades, em 2001 (...lá se vão 10 anos);

Aos meus colegas de laboratório, Ziliani, Rafael, Janaína, Patrícia, Diana, Giliard, Gustavo e Júlia, pelos momentos de descontração e amizade;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, pelo grande auxílio na interpretação dos resultados dos experimentos de estresse oxidativo e na paciência despendida;

Aos meus parceiros Patrícia Budni e Eduardo Parisotto (Bene), sempre dispostos a realização de qualquer experimento;

Ao Prof. Dr. Caio Maurício Mendes de Córdova, pelo grande auxílio na realização dos experimentos de biologia molecular;

Aos meus amigos, Wanderson (Wandéco) e Michele (Nega), que por muitas vezes escutaram minhas lamentações e sempre me apoiaram e incentivaram;

Ao amigo Cláudio Laurentino Guimarães, que sempre me apoiou e defendeu, mesmo algumas vezes se arriscando por conta de suas posições a meu favor.

A Universidade Regional de Blumenau, por conceder meu afastamento parcial sem redução em minha remuneração, durante estes três anos e meio;

Enfim, a todos as pessoas que, de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

DALMARCO, Eduardo Monguilhott. **Estudo dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante do micofenolato de mofetila no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.** 2011. 139 p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Introdução: O micofenolato de mofetila (MMF) é um fármaco imunossupressor utilizado atualmente na clínica na rejeição de transplantes de órgãos e em algumas doenças auto-imunes, como na uveíte e na glomerulonefrite. **Objetivos:** Avaliar o efeito anti-inflamatório e antioxidante do MMF administrado por via oral, na primeira (4 h) e segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina (Cg), no modelo da pleurisia, em camundongos. **Materiais e Métodos:** Neste protocolo experimental foram utilizados camundongos albinos suíços de 1 mês de idade. O modelo experimental utilizado foi o da pleurisia induzida pela Cg, segundo metodologia descrita por Saleh et al. (1996). A inflamação foi avaliada estudando-se alguns parâmetros da resposta inflamatória segundo metodologias já padronizadas e descritas na literatura (leucócitos e a exsudação), atividade das enzimas: mieloperoxidase (MPO), adenosina deaminase (ADA), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), as concentrações de: nitrito/nitrato (NOx) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Neste protocolo, também foram estudadas a influência do MMF sobre as concentrações das proteínas e sobre a transcrição do mRNA para o fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*), interleucina-1 beta (*IL-1 β*), fator de crescimento endotelial vascular alfa (*VEGF- α*), e interleucina 17A (*IL-17A*), utilizando-se as metodologias de enzima imunoensaio (ELISA) e a reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para a pesquisa da enzima óxido nítrico sintase induzida (ONSi) também foi utilizada a técnica de RT-PCR. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h e 48 h após a indução da pleurisia. Como fármacos de referência anti-inflamatória foram utilizados: a dexametasona (Dex, i.p.) e o ibuprofeno (Ibu, v.o.). Em alguns experimentos para avaliar a exsudação, os animais foram tratados 10 minutos antes da

aplicação da Cg, com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL, i.o.). Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o teste paramétrico ANOVA complementado, quando necessário, pelo teste de Dunnett, teste *t* de Student e teste de correlação de Pearson. Diferenças com $P < 0,05$ foram considerados significantes. **Resultados:** Em ambas as fases (4 h e 48 h) da resposta inflamatória induzida pela Cg, o MMF na dose de 100 mg/kg administrado por via oral (v.o.) inibiu os leucócitos ($P < 0,01$), a exsudação ($P < 0,01$), as atividades de: MPO ($P < 0,05$), ADA ($P < 0,01$), CAT ($P < 0,05$), SOD ($P < 0,05$), GPx ($P < 0,01$) e GST ($P < 0,01$), as concentrações de: nitrito/nitrato (ON_x) ($P < 0,01$) e TBARS ($P < 0,05$). Além disso, o fármaco também inibiu aumento das concentrações e a transcrição do mRNA de: TNF- α ($P < 0,01$), IL-1 β ($P < 0,01$), VEGF- α ($P < 0,01$) e IL-17A ($P < 0,01$), bem como a transcrição da enzima ONSi ($P < 0,01$). **Conclusão:** Os resultados demonstraram que o MMF possui importante efeito anti-inflamatório e antioxidante, inibindo mediadores e enzimas que participam da resposta inflamatória no modelo da pleurisia em camundongos. Este efeito parece ocorrer também em nível pré-transcricional uma vez que o MMF foi capaz de inibir não somente as concentrações de citocinas formadas, mas também a transcrição do mRNA para estas proteínas.

Palavras-chave: Micofenolato de mofetila, pleurisia, efeito anti-inflamatório, efeito antioxidante, camundongos.

DALMARCO, Eduardo Monguilhott. **Study of anti-inflammatory and anti-oxidant effects of micophenolate mofetil in the mouse modelo f pleurisy.** 2011. 139 p. Thesis (Doctorate in Pharmacy) – Postgraduate Program of Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Mycophenolate mofetil (MMF) is an immunosuppressive agent currently used in the clinic to prevent the rejection of organ transplants and some autoimmune diseases such as uveitis and glomerulonephritis. **Objectives:** The aim of this study was study the anti-inflammatory and anti-oxidant effects of MMF, in the first (4 h) and second (48 h) phases of the inflammatory response induced by carrageenan (Cg), in the mouse model of pleurisy. **Materials and Methods:** The mouse model of pleurisy was used according to the methodologies described by Saleh et al. (1996). The inflammation was evaluated by studying inflammatory parameters according to the methods described in the literature (leukocytes and exudation (SALEH et al., 1996), enzymes activities: myeloperoxidase (MPO) (RAO et al., 1993) adenosine deaminase (ADA) (GIUSTI and GALANTI, 1984), catalase (CAT) (AEBI, 1984), glutathione peroxidase (GPx) (FLOÉ and GÜNZLER, 1984), and glutathione S-transferase (GST) (HABIG et al. 1976), superoxide dismutase (SOD) (MISRA and FRIDOVICH, 1972), concentrations of nitrite/nitrate (NO_x) (GREEN et al., 1982), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (BIRD and DRAPER, 1984)). In this protocol, we also studied the concentrations, as well as the mRNA transcription for tumor necrosis factor alpha (*TNF-α*), interleukin-1 beta (*IL-1β*), vascular endothelial growth factor alpha (*VEGF-α*) and interleukin 17A (*IL-17A*), using enzyme immunoassay (ELISA) and reverse transcriptase reaction followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). The nitric oxide synthase (iNOS) was also performed by RT-PCR. The inflammatory parameters were evaluated 4 h and 48 h after pleurisy induction. Dexamethasone (Dex, i.p.) and ibuprofen (Ibu, p.o.) were used as reference drugs. In some experiments to evaluate the exudation, the animals were treated (10 minutes before Cg administration) with Evans blue solution (25 mg / kg, 0.2 mL, i.o.). For statistical analysis we used ANOVA

supplemented by Dunnett's test, when required, Student's *t* test. $P < 0.05$ was considered significant. **Results:** In both phases (4 h and 48 h) of the inflammatory response induced by carrageenan, MMF (100 mg/kg) administered by oral route (p.o) inhibited leukocytes ($P < 0.01$), exudation ($P < 0.01$), MPO ($P < 0.05$), ADA ($P < 0.01$), CAT ($P < 0.05$), SOD ($P < 0.05$), GPx ($P < 0.01$) and GST ($P < 0.01$) activities, nitrite / nitrate (NO_x) ($P < 0.01$) and TBARS ($P < 0.05$) concentrations. In addition, this drug also inhibited the concentrations and mRNA transcription of: *TNF- α* ($P < 0.01$), *IL-1 β* ($P < 0.01$), *VEGF- α* ($P < 0.01$) and *IL-17A* ($P < 0.01$), and expression of nitric oxide synthase (iNOS) ($P < 0.01$). **Conclusion:** The results showed that MMF has important anti-inflammatory and antioxidant effects, by inhibiting mediators involved in the inflammatory response and reducing antioxidant enzymes activities, in mice model of pleurisy. This effect appears to occur also at the pre-transcriptional level, since MMF was able to inhibit not only the levels of cytokines formed, but also the transcription of mRNA for these proteins.

Keywords: Mycophenolate mofetil, pleurisy, anti-inflammatory, antioxidant, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do micofenolato de mofetila (MMF)	19
Figura 2 - Esquema demonstrando o perfil de resposta inflamatório bifásico do modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos	28
Figura 3 - Efeito do Micofenolato de mofetila (1 - 200 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h, em camundongos	45
Figura 4 - Efeito do Micofenolato de mofetila (1 - 200 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h, em camundongos	46
Figura 5 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), na pleurisia 4 h e 48 h	48
Figura 6 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase (ADA), na pleurisia 4 h e 48 h	49
Figura 7 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre concentrações de nitrito e nitrato (NO _x), na pleurisia 4 h e 48 h	50
Figura 8 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações da citocina fator de necrose tumoral-alfa (<i>TNF-α</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	52
Figura 9 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações da citocina interleucina-1 beta (<i>IL-1β</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	53
Figura 10 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações da citocina fator de crescimento endotelial vascular-alfa (<i>VEGF-α</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	54

Figura 11 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações da citocina interleucina 17A (<i>IL-17A</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	55
Figura 12 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a citocina fator de necrose tumoral alfa (<i>TNF-α</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	57
Figura 13 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a citocina interleucina-1 beta (<i>IL-1β</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	58
Figura 14 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a citocina fator de crescimento vascular endotelial alfa (<i>VEGF-α</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	59
Figura 15 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a citocina interleucina 17A (<i>IL-17A</i>), na pleurisia 4 h e 48 h	60
Figura 16 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a enzima ONSi, na pleurisia 4 h e 48 h	62
Figura 17 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima Catalase (CAT), na pleurisia 4 h e 48 h	64
Figura 18 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD), na pleurisia 4 h e 48 h	65
Figura 19 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima Glutationa peroxidase (GPx), na pleurisia 4 h e 48 h	66
Figura 20 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima Glutationa S-transferase (GST), na pleurisia 4 h e 48 h	67
Figura 21 - Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), na pleurisia 4 h e 48 h	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições usadas nas reações de RT-PCR

37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina deaminase
ADA-1	Isoenzima adenosina deaminase 1
ADA-2	Isoenzima adenosina deaminase 2
AP-1	Proteína ativadora 1 (Fator de transcrição nuclear)
Balb/c	Linhagem de camundongos Balb/c
Bax	Proteína pró-apoptótica da família da Bcl-2
Bcl-2	Família de proteínas relacionadas a apoptose
Bcl-x ₁	Proteína anti-apoptótica da família da Bcl-2
C57BL/6	Linhagem de camundongos C57BL/6
CAT	Catalase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD4+	Proteína de superfície expressa em linfócitos T auxiliares
CD8+	Proteína de superfície expressa em linfócitos T citotóxicos
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEEA	Comitê de ética na experimentação com animais
Cg	Carragenina
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dex	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Enzima desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DTT	Ditiotreitól
ELISA	Enzimaimunoensaio
ERK ½	Quinases ½ relacionadas a sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
EROs	Espécies reativas do oxigênio
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias
GP _x	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
GTP	Guanosina trifosfato
HUVECs	Células endoteliais de veia umbilical humana
IL-10	Interleucina-10
IL-17A	Interleucina-17 A
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL1-Ra	Antagonista de receptor de IL-1
IL-4	Interleucina-4

IL-6	Interleucina-6
IMPDH	Inosina monofosfato desidrogenase
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
I κ B α	Subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF-kB
i.p.	Administrado por via intraperitoneal
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
BK	Bradicinina
Keap 1	Subunidade citoplasmática inativa do fator de transcrição nuclear NrF2
LPS	Lipopolissacarídeo
Maf	Subunidade nuclear do fator de transcrição nuclear NrF2
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MFA	Ácido micofenólico
MMF	Micofenolato de mofetila
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NAPDH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-kappa B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NrF2	Fator de transcrição nuclear eritróide relacionado ao fator 2
ONS	Óxido nítrico sintase
ON	Óxido nítrico
ONS I ou	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
ONS _n	
ONS II ou	Óxido nítrico sintase induzida
ONS _i	
ONS III ou	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
ONS _e	
ON _x	Nitrito/Nitrato
OVA	Ovalbumina
p38 MAPK	Proteína quinase mitógeno-ativada subunidade p38
p50	Subunidade (p50) do fator de transcrição nuclear NF-kB
p65	Subunidade (p65) do fator de transcrição nuclear NF-kB
PBS	Tampão fosfato/salina
PGE ₁	Prostaglandina E1
PGE ₂	Prostaglandina E2
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Enzima que degrada o RNA
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SOD	Superóxido dismutase
Taq DNA polimerase	Enzima que amplifica fragmentos de DNA

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
tBuOOH	Tert-butilhidroperóxido
TGF- β	Fator transformante de colônias beta
TH17	Linhagem de células T <i>helper</i> 17
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF- α	Fator de crescimento endotelial vascular alfa
v.o.	Administrado por via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Micofenolato de mofetila	19
1.2	O Processo inflamatório	20
1.3	Modelos de inflamação das vias aéreas	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Procedimento anestésico	30
3.3	Eutanásia dos animais	30
3.4	Pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos	30
3.5	Contagem total e diferencial dos leucócitos	30
3.5.1	Coloração dos esfregaços celulares	32
3.6	Determinação da exsudação	32
3.7	Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase	32
3.8	Determinação da atividade da enzima adenosina-deaminase	33
3.9	Determinação das concentrações de nitrito/Nitrato	33
3.10	Determinação das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , VEGF- α e IL-17A)	34
3.11	Determinação da transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , VEGF- α e IL-17A) e para a enzima óxido nítrico sintase induzida	34
3.11.1	Extração e quantificação do RNA total	34
3.11.2	Reação de transcrição reversa (RT)	35

3.11.3	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	36
3.12	Determinação da atividade da enzima catalase	38
3.13	Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase	38
3.14	Determinação da atividade da enzima glutathiona Peroxidase	39
3.15	Determinação da atividade da enzima glutathiona S Transferase	39
3.16	Determinação das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiubarbitúrico	39
3.17	Protocolo experimental	40
3.18	Fármacos e Reagentes	41
3.19	Análise Estatística	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Análise do efeito anti-inflamatório do micofenolato de Mofetila	43
4.1.1	Efeito do micofenolato de mofetila sobre a contagem total e diferencial de leucócitos e exsudação	43
4.1.2	Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima mieloperoxidase	47
4.1.3	Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase	47
4.1.4	Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações de nitrito/nitrato	47
4.1.5	Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , VEGF- α e IL-17A)	51

4.1.6	Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , VEGF- α e IL-17A)	56
4.1.7	Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a enzima óxido nítrico sintase induzida	61
4.2	Análise do efeito antioxidante do micofenolato de mofetila	63
4.2.1	Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade das enzimas antioxidantes: Catalase, Superóxido-dismutase, Glutaciona peroxidase e Glutaciona S-transferase	63
4.2.2	Efeito do micofenolato de mofetila sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	68
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXOS	94
	ANEXO 1: Protocolo de aprovação no Comitê de Ética na Experimentação com Animais (CEEA/FURB) (022/2006)	94
	ANEXO 2: Protocolo de aprovação no Comitê de Ética na Experimentação com Animais (CEEA/FURB) (022/2007)	96
	ANEXO 3: Resumos apresentados em anais de congressos	98
	ANEXO 4: Prêmio Internacional de melhor Resumo	103
	ANEXO 5: Artigo publicado	106
	ANEXO 6: Artigo submetido a publicação	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Micofenolato de mofetila

Uma vez ingerido o micofenolato de mofetila (MMF) (Figura 1), é transformado pelas esterases intestinais em seu metabólito ativo, o ácido micofenólico (MFA) que é um potente inibidor seletivo e não competitivo da isoforma 2 da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH). Esta enzima é importante para a síntese de: nucleotídeos guanosínicos (purinas), ácido riboxinucleotídeo (RNA) e ácido desoxiribonucleotídeo (DNA) (ALLISON e EUGUI, 2000).

A síntese das purinas é fisiologicamente mediada por duas principais vias, uma denominada de via “*selvagem*” e a outra denominada de via “*de novo*”, sendo que os linfócitos T e B são mais dependentes desta última via. E é justamente nesta última via (via *de novo*) que a enzima IMPDH participa da resposta imunológica, o que denota importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial atividade anti-inflamatória (ALLISON e EUGUI, 1993).

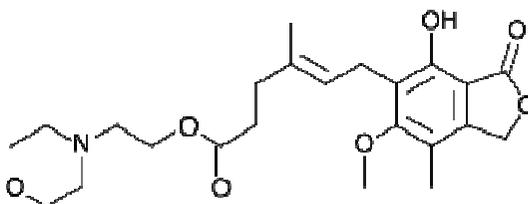


Figura 1 - Estrutura química do micofenolato de mofetila (MMF)

O MFA tem efeito citostático mais potente sobre os linfócitos que sobre outros tipos celulares, e este é o principal mecanismo pelo qual é exercida a atividade imunossupressora. O MFA também diminui as reservas de guanosina trifosfato (GTP) presentes nos linfócitos e monócitos humanos, inibindo a síntese de fucose e manose-sacarídeo, que são componentes das glicoproteínas de membrana. Isso faz com que seja reduzida drasticamente a produção de moléculas de adesão da família das selectinas. Por este mecanismo, o MFA diminui o recrutamento de linfócitos e monócitos para o sítio do enxerto (ALLISON e EUGUI, 1996).

O MFA é mais seletivo em inibir a isoforma 2 da IMPDH, expressa em linfócitos ativados, do que a isoforma 1 da IMPDH, expressa em outros tipos de células, o que faz com que o micofenolato seja muito mais ativo sobre os linfócitos do que sobre outras células.

Estudos já demonstraram que o MMF induz: 1) apoptose em células T ativadas, diminuindo os clones celulares em resposta à estimulação antigênica; 2) depleção dos nucleotídeos de guanosina, diminuindo a glicosilação e a expressão de moléculas de adesão do tipo integrinas, o que reduz o influxo de linfócitos e monócitos no sítio inflamatório; e 3) depleção de nucleotídeos de guanosina, diminuindo as concentrações de tetrahydrobiopterina, um co-fator importante para a atividade da ONSi. Este fato resulta na diminuição da produção de ON e consequentemente de peroxinitrito (ONOO⁻), diminuindo os danos celulares (ALLISON e EUGUI, 2000).

1.2. Processo Inflamatório

A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente ou do estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de um novo tecido. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis pela vasodilatação, extravasamento de líquido e migração de leucócitos (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2008).

O sistema fagocítico mononuclear é composto por dois tipos de células que participam na defesa do sistema imune do hospedeiro, desenvolvendo funções distintas: os macrófagos e os monócitos. Os macrófagos têm a função de remover antígenos particulados e atuar como células apresentadoras de antígeno, internalizando e apresentando antígenos aos linfócitos T (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). Os monócitos encontram-se circulando no sangue e, quando necessário, migram para diferentes órgãos e cavidades do corpo em resposta a um estímulo lesivo, diferenciando-se em macrófagos. Além disso, os leucócitos do tipo mononucleares estão envolvidos no desenvolvimento e na manutenção de diversas doenças inflamatórias como: lúpus eritematoso sistêmico (KIS-TOTH e TSOKOS, 2010), artrite reumatóide (SCHETT, 2007), além de doenças inflamatórias das vias aéreas, como a asma brônquica (NEGRETE-GARCÍA et al., 2010).

Dentre as enzimas envolvidas na resposta inflamatória, mais importantes, destaca-se a adenosina-deaminase (ADA). Esta enzima é

liberada principalmente por linfócitos ativados e também possui papel fundamental na maturação e na ativação de monócitos e linfócitos (ZHOU et al., 2009). A ADA participa do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente. A atividade desta enzima ocorre por meio da ação de duas isoenzimas denominadas ADA-1 e ADA-2 (NAKAMACHI et al., 2003). As respostas biológicas à adenosina e inosina são mediadas por quatro receptores distintos (A1, A2A, A2B e A3) que são acoplados a proteínas G. A estimulação de cada receptor destes induz uma resposta funcional distinta, podendo o efeito resultante ser pró- ou anti-inflamatório (FREDHOLM, 2010). O fato dos receptores de adenosina serem expressos em diferentes células, principalmente aquelas presentes nas vias aéreas, deixa claro o papel desta enzima na resposta inflamatória associada à asma brônquica, além de outras doenças de caráter inflamatório crônico (SPICUZZA et al., 2006; VASS e HORVÁTH, 2008).

Já os leucócitos do tipo polimorfonucleares são as primeiras células que são ativadas na defesa imune do hospedeiro contra infecção. Estas células migram e infiltram-se no sítio inflamatório por meio da liberação de mediadores quimiotáticos, juntamente com os macrófagos, fagocitam e destroem o agente indutor da inflamação. Este tipo de célula desempenha papel central na maioria das doenças inflamatórias, inclusive na doença pulmonar obstrutiva crônica (GÓRSKA et al., 2010), e na asma brônquica (MONTESEIRIN, 2009). A destruição do agente estranho ocorre por meio da liberação de enzimas hidrolíticas, proteínas bactericidas e espécies reativas de oxigênio (EROS), estocadas nos grânulos dos polimorfonucleares (CASCAO et al., 2009). Dentre estas enzimas, destaca-se a mieloperoxidase (MPO), uma protease presente nos grânulos azurófilos de polimorfonucleares e monócitos (HANSSON et al., 2006).

A MPO, juntamente com o sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), está envolvida na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS). A NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular ao radical ânion superóxido. A seguir, a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual destrói as bactérias diretamente, ou após a sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso (KLEBANOFF, 2005). Além disso, o ácido hipocloroso é considerado um potente agente microbicida e possui papel importante na defesa do hospedeiro contra a invasão de bactérias, fungos e vírus (HANSSON et al., 2006). Contudo, o aumento nas concentrações tissulares de polimorfonucleares ativados,

e a liberação excessiva de enzimas como a MPO, proteinase 3, elastase, além da catépsina G, induzem a liberação de grandes quantidades de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que, por sua vez, promovem importantes lesões em tecidos do próprio hospedeiro (MEDZHITOV, 2008). O envolvimento da MPO em doenças inflamatórias das vias aéreas é bem documentado, inclusive na exacerbação da asma brônquica e na doença obstrutiva crônica (BATHOORN et al., 2009; ICHINOSE, 2009).

O estresse oxidativo induzido pela geração de EROs como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila parece ser um dos fatores primários na etiologia de diversas doenças de caráter inflamatório (VALKO et al., 2007). As células ativadas, como os macrófagos e os polimorfonucleares, liberam EROs, que podem reagir com várias biomoléculas levando à lesão de proteínas, lipídeos e também do ácido desoxirribonucléico (DNA) de células vizinhas no local do processo inflamatório (CIENCEWICKI et al., 2008). Recentemente, o balanço redox e as EROs, em termos de sobrevivência, proliferação e morte celular, ganhou destaque na comunidade científica no estudo de diversas doenças autoimunes como a uveíte e a glomerulonefrite (KRAVCHUK, 2004; PEDZIK et al., 2010). Além disso, existem evidências do envolvimento de EROS e ERNs como o ânion superóxido, óxido nítrico, entre outros que induzem, por sua vez, a peroxidação lipídica.

Existem também relatos demonstrando que a peroxidação lipídica está envolvida na síndrome metabólica, na insuficiência renal, na hipertensão, assim como nos processos inflamatórios. As espécies reativas geradas pelo estresse oxidativo são capazes de lesar o DNA, os lipídeos microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças auto-imunes, como, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide (VALKO et al., 2007). Além disso, EROS e ERNs exercem importante função como mensageiros para a amplificação e a manutenção do processo inflamatório (CARTA et al., 2009). Alguns autores têm ressaltado que o controle sobre a geração excessiva de espécies reativas contribui, de forma significativa, à melhora do quadro clínico de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (WALTERS et al., 2008), ou asma brônquica (COMHAIR e ERZURUM, 2010).

Outro mediador importante, e envolvido na resposta inflamatória, é o óxido nítrico (ON). Trata-se de um gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido

nítrico sintase (ONS). O ON tem função importante na sinalização celular e está envolvido no relaxamento vascular, na modulação da agregação plaquetária e na inibição da adesão leucocitária (LUIKING et al., 2010). Existem três isoformas distintas de ONS: ONS neuronal (ONS_n ou ONS I), ONS endotelial (ONS_e ou ONS III), ambas formas são constitutivas e estão localizadas no tecido nervoso central e nas células endoteliais, respectivamente, e a ONS induzida (ONS_i ou ONSII) participante dos processos inflamatórios (HONG et al., 2009).

A ONS_i é ativada em resposta a estímulos inflamatórios como, por exemplo, mediadores endógenos: quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 beta: *IL-1β*, fator de necrose tumoral alfa: *TNF-α*, interferon gama: *IFN-γ*, etc.), bem como por fatores exógenos, incluindo: endotoxinas bacterianas, infecções virais, poluentes ambientais (estresse oxidativo), hipóxia, tumores, alérgenos, entre outros (BOVE e VAN DER VLIET, 2006). A ONS_i libera grandes quantidades de ON rapidamente, podendo manter essa liberação por horas ou dias (KORHONEN et al., 2005). A expressão de ONS_i ocorre principalmente em células epiteliais (HEMMRICH et al., 2005), mas também em macrófagos (WU e TSAI, 2007), eosinófilos (KORHONEN et al., 2005) e células da musculatura lisa vascular quando estas são ativadas por mediadores da resposta inflamatória (BATRA et al., 2007). Os efeitos deletérios do ON são decorrentes da sua interação com EROS, formando outras espécies reativas, as denominadas ERNS. Atualmente, é bem definido o envolvimento do ON na aterosclerose e nas doenças neuro-degenerativas (RYTER et al., 2007; VALKO et al., 2007). Além disso, atualmente, o monitoramento da expiração de ON em pacientes com asma brônquica está sendo utilizada para avaliar a severidade da doença, e da resposta destes pacientes ao tratamento com glicocorticóides (PAVORD e MARTIN, 2009; WEDES et al., 2009).

Outros mediadores que participam do processo inflamatório são as citocinas. As citocinas são um grupo de proteínas solúveis, ou proteínas de membrana celular, ou glicoproteínas mensageiras, com função parácrina. Estudos já identificaram mais de 200 citocinas, que são classificadas em subgrupos, como por exemplo: interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia. Em relação ao processo inflamatório, tradicionalmente são divididas em: pró-inflamatórias (*IL-1*, *IL-6*, *TNF-α*, *TGF-β*, *IL-17A*) e anti-inflamatórias (*IL-10*, *IL-4*, *IL-1Ra*: antagonista de receptor de *IL-1*). Estas últimas ainda estão envolvidas no crescimento, na diferenciação e na ativação celular, na imunidade e no reparo tecidual, além de outras funções (BUDHU e

WANG, 2006; COMMINS et al., 2010; HIPPE et al., 2010). Diversos são os estímulos para a liberação das citocinas, incluindo bactérias, vírus, parasitas, fungos, tumores, traumas, estímulos físicos (queimaduras, irradiações), necrose tecidual (infarto), células ativadas que participam da resposta imune, entre outros (BUDHU e WANG, 2006).

A função das citocinas é especificamente celular, e mediada por ativação de receptores localizados na superfície da célula alvo. Estes mediadores solúveis possuem função autócrina, parácrina e/ou sistêmica (COMMINS et al., 2010; HIPPE et al., 2010). O balanço inadequado entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias durante a resposta imune é crítico na resolução, ou não, da inflamação (CORSINI et al., 2005). Dentre as citocinas pro-inflamatórias, podemos destacar o *TNF- α* , a *IL-1 β* , o *VEGF- α* , e a recém descrita *IL-17*. Embora diversas citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidas no processo inflamatório, já está bem estabelecido que o *TNF- α* e a *IL-1 β* exercem papel central na inflamação aguda induzida pela carragenina, no modelo da pleurisia, em camundongos (FRÖDE et al., 2001). A secreção destas citocinas está sob controle dos fatores de transcrição nuclear, dentre eles o fator de transcrição nuclear NF-kappa B (NF- κ B). A ativação deste fator de transcrição tem sido demonstrado em diversos modelos, dentre eles o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos (CUZZOCREA et al., 2008). Além disso, o envolvimento destas citocinas (*TNF- α* , *IL-1 β* e *VEGF- α*) em doenças inflamatórias está também bem documentado, como por exemplo, o papel do *TNF- α* e da *IL-1 β* na artrite reumatóide (MA et al., 2010; YANG et al., 2010), o envolvimento do *TNF- α* no lúpus eritematoso sistêmico (ZHU et al., 2010), além da participação do *TNF- α* , da *IL-1 β* e do *VEGF- α* na asma brônquica (FELTIS, et al. 2006; SIDIQUI et al., 2007; CHAROKOPOS et al., 2009; FUJISAWA et al., 2009).

Mais recentemente, estudos têm relatado que os linfócitos T CD4+ e CD8+, assim como os leucócitos polimorfonucleares, secretam a citocina pro-inflamatória *IL-17* (MILLS et al., 2008). Este é um novo mediador que pode estimular a produção e/ou liberação de outras substâncias pró-inflamatórias como: *TNF- α* , *IL-1 β* e quimiocinas, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, como por exemplo, em culturas de macrófagos humanos estimulados com LPS e em modelos de inflamação (edema e bolsa de ar) induzidos por diversos agentes flogísticos, em camundongos (MILLS, 2008; MAIONE et al., 2009). A *IL-17* ainda promove a granulopoiese e a mobilização de polimorfonucleares para o local da infecção (IWAKURA et al. 2008).

1.3 Modelos de Inflamação das vias aéreas

Durante muitos anos se tem procurado modelos experimentais que mimetizem as doenças inflamatórias humanas. Atualmente não existe um único modelo animal que mimetize a asma brônquica. O principal motivo é a complexidade da doença, o que faz com que o estudo da asma seja bastante limitado.

No entanto, apesar das suas limitações, os modelos experimentais que existem atualmente e que mimetizam doenças inflamatórias das vias aéreas, como a asma, permitem avaliar as alterações morfológicas, imunológicas e fisiológicas, uma vez que mimetizam alguns eventos que ocorrem nesta doença, como a liberação de mediadores inflamatórios. Dentre estes destacam-se: o modelo de asma eosinofílica. Neste modelo, utiliza-se camundongos das linhagens BALB/c ou C57BL/6 sensibilizados com ovalbumina (OVA) e adjuvante (hidróxido de alumínio). Um ou dois dias após o desafio com a ovalbumina, o lavado bronco-alveolar é coletado e avalia-se parâmetros inflamatórios, como por exemplo: infiltrado celular e mediadores químicos (FUKUNAGA et al., 2007).

Outro modelo de asma, é a utilização de vírus, uma vez que este tipo de infecção é bastante comum em pacientes com asma brônquica e/ou doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), além disso, os pacientes asmáticos comumente apresentam exacerbações da asma quando acometidos por infecções virais. Dentre estes, destacam-se o da inoculação do vírus Sendai em camundongos, que mimetiza a infecção causada pelo vírus sincicial respiratório, em humanos (HEATH, 1970; OPENSHAW, 1995). Estes modelos também permitem avaliar parâmetros imunológicos sistêmicos e locais, como o remodelamento das vias aéreas, a liberação de diversos mediadores inflamatórios, e a celularidade. A grande dificuldade na utilização deste último modelo experimental advém da necessidade de investimentos em infraestrutura, considerando que o cultivo e os métodos de infecção viral são muito mais complexos, principalmente em relação às normas de biossegurança.

Existem também modelos que combinam dois ou mais fatores, como por exemplo: camundongos expostos a alérgenos e vírus, já que muitos estudos demonstram que os pacientes com asma alérgica e expostos a infecções virais apresentam episódios de hiperresponsividade das vias aéreas e exacerbação da doença (NAGARKAR et al., 2010).

Além disso, vários estudos têm demonstrado que alguns pacientes desenvolvem asma com uma resposta predominantemente do

tipo neutrofílica. Por este motivo, também existem modelos que mimetizam esta condição, como por exemplo: a indução de infecção pulmonar em camundongos com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (TAM et al., 1999). Outro modelo também bastante difundido é o da utilização de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) administrado sistemicamente e que estimula a resposta imune pulmonar. Este é mais um modelo que permite a avaliação de celularidade e da liberação de mediadores inflamatórios sem que seja necessário recorrer a procedimentos e técnicas complicadas (KNAPP et al., 2006).

O modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos, caracteriza-se também por ser um modelo de inflamação com resposta predominantemente neutrofílica, além de possuir algumas vantagens em relação a outros modelos experimentais. Dentre as vantagens cita-se a fácil coleta do lavado pleural, pelo qual é possível analisar e quantificar diversos parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação e mediadores inflamatórios. O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (YAMAMOTO et al., 1975; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989). Com o desenvolvimento deste modelo foi possível então fazer uma avaliação não só do extravasamento de líquido como da migração de células induzidos por diversos agentes flogísticos (DE BRITO, 1989; SALEH et al., 1996; 1997; 1999). A técnica de pleurisia possui vantagens em relação à do edema de pata pois, a partir da coleta do lavado na cavidade pleural, é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional da pleurisia é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados.

Conforme ilustra a figura 2, no modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, ocorre uma resposta inflamatória do tipo bifásica, caracterizada por uma primeira fase, também denominada de fase recente, que ocorre 4 h após a administração da carragenina na cavidade pleural destes animais. Nesta fase evidencia-se aumento significativo da exsudação, bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares na cavidade pleural. A segunda fase ou fase tardia ocorre 48 h após, e é caracterizada pelo aumento ainda maior da exsudação e de leucócitos do tipo mononucleares (SALEH et al., 1996; DALMARCO et al., 2002).

De um modo geral, a inflamação induzida na cavidade pleural é lenta e prolongada em comparação com aquela desenvolvida na pele.

Isto se deve ao fato de haver diferenças na resposta aos mediadores inflamatórios, na drenagem linfática, bem como nos tipos celulares envolvidos. Por exemplo: 5-hidroxitriptamina (5-HT), bradicinina (BK) e prostaglandina E₁ (PGE₁) e prostaglandina E₂ (PGE₂), produzem pouca exsudação quando administradas isoladamente ou em combinação na cavidade pleural. Ao contrário, na pele, estes mediadores induzem rapidamente a formação de edema (VINEGAR et al., 1976). Além disso, a cavidade pleural ocupa uma superfície relativamente grande. Admitese que o sítio primário da inflamação na cavidade pleural seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório, induzido experimentalmente na cavidade, pode ocorrer acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudato. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório. Além disso, o tipo, a intensidade e a duração da inflamação produzida pela injeção de um agente flogístico dependerá da sua persistência na cavidade pleural e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares.

Nesta tese, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima, destacando sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória, bem como avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante do fármaco MMF.

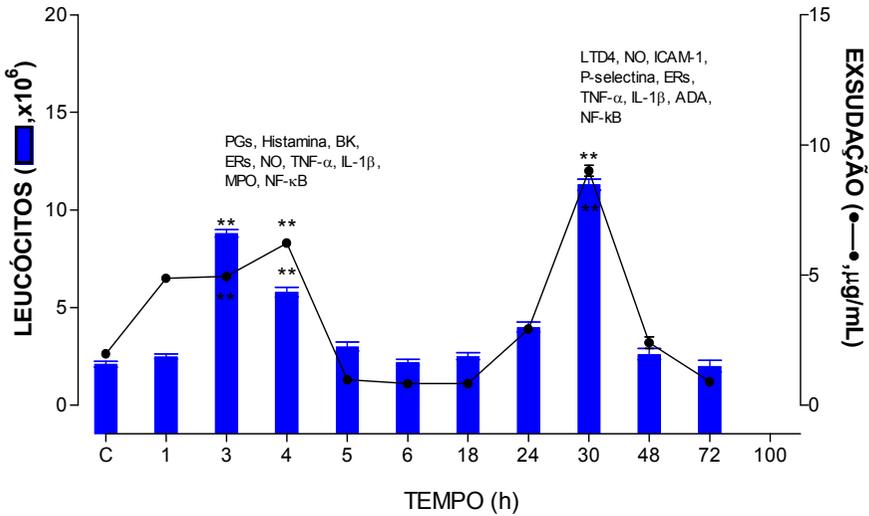


Figura 2 – Esquema demonstrando o perfil de resposta inflamatória bifásica do modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Retirado de SALEH et al., 1996. ADA: adenosina deaminase, BK: bradicinina, ERs: espécies reativas, ICAM-1: molécula de adesão do tipo integrina (ICAM-1), IL-1 β : interleucina-1 beta, LTD4: leucotrieno D4, MPO: mieloperoxidase, NO: óxido nítrico, NF- κ B: Fator de transcrição nuclear κ B, PGs: prostaglandinas, P-selectina: molécula de adesão do tipo selectina P (P-selectina), TNF- α : fator de necrose tumoral alfa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito anti-inflamatório e antioxidante do micofenolato de mofetila (MMF) administrado por via oral no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estudar o efeito do MMF, sobre a migração de leucócitos e a exsudação;
- II. Verificar o efeito do fármaco sobre a atividade das enzimas: Adenosina-deaminase (ADA), Catalase (CAT), Glutaciona peroxidase (GPx), Glutaciona S-transferase (GST), Mieloperoxidase (MPO) e Superóxido dismutase (SOD);
- III. Analisar o efeito do fármaco sobre as concentrações do(a): Fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), Interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), Fator de crescimento vascular endotelial ($VEGF-\alpha$), Interleucina-17A ($IL-17A$) e Nitrito/Nitrato (NOx);
- IV. Avaliar o efeito do fármaco sobre a transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $VEGF-\alpha$ e $IL-17A$) e para a enzima óxido nítrico sintase induzida (ONSi);
- V. Verificar a ação do fármaco sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

O estudo foi constituído utilizando 350 (trezentos e cinquenta) camundongos albinos suíços, 1 mês de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da FURB (Universidade Regional de Blumenau).

Os animais mencionados foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, sob temperatura ambiente e luz natural. Estes animais receberam alimentação e água durante todos os experimentos. Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética na experimentação com animais (CEEA) da FURB sob protocolos Nº 022/06 e 022/07 (Anexos 1 e 2).

3.2 Procedimento Anestésico

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, i.v., intraorbital) com o objetivo de avaliarmos de forma indireta a exsudação.

3.3 Eutanásia dos Animais

Os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital (60 mg/kg, i.p.), administrado por via intraperitoneal.

3.4 Pleurisia induzida pela Carragenina

No dia dos experimentos, os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrado na cavidade pleural direita, através do espaço intercostal, utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno. De acordo com cada protocolo experimental, após a administração da carragenina ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital em 4 h e 48 h após a indução da inflamação. A seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Posteriormente, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, a

cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, NaCl (130 mmol/L), Na₂HPO₄ (5 mmol/L), KH₂PO₄ (1 mmol/L) e heparina (20 UI/mL)). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de células. De acordo com o protocolo experimental, 10 minutos antes dos experimentos, alguns grupos de animais foram tratados com solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural.

Para análise de enzimas, citocinas, NO_x e TBARS, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans, uma vez que o mesmo interfere nas dosagens colorimétricas para a quantificação destes parâmetros.

Para análise da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx e GST), o protocolo experimental de tratamento e indução da pleurisia foi idêntico ao descrito anteriormente, exceto que o material analisado foi o sangue total obtido por punção cardíaca após indução anestésica.

Para a determinação da transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α* , *IL-1 β* , *VEGF- α* e *IL-17A*) e para a enzima ONSi, o protocolo experimental de tratamento e indução da pleurisia foi semelhante ao descrito inicialmente, exceto que o material utilizado para análise foram amostras teciduais dos pulmões (cerca de 200 mg).

3.5 Contagem total e diferencial dos leucócitos

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 μ L) foram reservadas para a contagem celular total, utilizando-se líquido de Türk (1:20) e câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio ótico comum (aumento 400 vezes). Os esfregaços celulares foram realizados para a contagem diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA), estes foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada também em microscópio ótico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

3.5.1 Coloração dos esfregaços celulares

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa). As lâminas contendo o sedimento dos lavados pleurais após centrifugação em citocentrífuga foram secas em posição horizontal à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL de corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento por 2 min. A seguir adicionou-se água deionizada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. A seguir, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

3.6 Determinação da exsudação

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 μ L) do lavado pleural foi reservada para a determinação da concentração de Azul de Evans em leitor de enzima-imunoensaio (ELISA) (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto, Medeiros (1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01 - 50 μ g/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas, e formulou-se uma equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans nas amostras foram interpolados com base na reta padrão e expressos em μ g/mL.

3.7 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase

Neste grupo de experimentos, imediatamente após o sacrifício dos animais, uma amostra do lavado pleural de camundongos foi coletada e imediatamente processada para a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) segundo metodologia descrita por Rao et al. (1993). Volumes de 20 μ L do lavado da cavidade pleural ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL)) foram transferidos para as placas de ELISA e a reação bioquímica iniciada com a adição de 180 μ L de solução (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H_2O_2). Após 15 min de incubação, à temperatura

ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μL de azida sódica (1%). A seguir, as placas contendo as amostras foram lidas em densidade ótica (450 nm) em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.8 Determinação da Atividade da Adenosina-deaminase

Inicialmente amostras padrão com concentrações conhecidas (volume final 2,5 mL) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e NH_3SO_4 (15 mM) foram preparadas com a finalidade de se obter uma curva-padrão (10 - 50 UI/L). As amostras do lavado pleural (20 μL) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6,5, 500 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000 μL) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (1000 μL : NaOCl: 11 mM e NaOH: 125 mM). Esta solução também foi adicionada as cubetas contendo concentrações diferentes das amostras padrão (volume final 2500 μL) (GIUSTI e GALANTI, 1984). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). A quantificação da atividade desconhecida da enzima adenosina-deaminase (ADA) foi expressa em U/L, com auxílio da equação da reta.

3.9 Determinação das concentrações de nitrito e nitrato

O óxido nítrico (ON) foi indiretamente quantificado pela formação de seus metabólitos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). No dia dos experimentos, 300 μL de cada amostra do lavado pleural foi submetida à desproteinização. Para cada amostra, foram adicionados 20 μL de solução de sulfato de zinco (20%) e incubadas em banho de gelo por 60 min. As amostras foram centrifugadas (2.000 x g por 15 min.) e o resultado final desta primeira etapa foi a obtenção de um sobrenadante límpido. A seguir, 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma cubeta e diluídos em solução contendo 200 μL de solução saturada de

cloreto de vanádio III (0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl) (3%) (p/v) (MIRANDA et al., 2001). Nesta mesma cubeta foram adicionados 300 μ L de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e incubado durante 40 min., à 37^o. C. A reação de NO₂⁻ com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO₂⁻ (0 -150 μ M) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato, em μ M, com auxílio da equação da reta.

3.10 Determinação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α* , *IL-1 β* , *VEGF- α* e *IL-17A*)

Neste grupo de experimentos, imediatamente após o sacrifício dos animais, amostras do lavado pleural foram coletadas e processadas para a realização da técnica de ELISA fase sólida, método sanduíche. As sensibilidades identificadas nos kits foram: *TNF- α* = 5,0 pg/mL, *IL-1 β* = 1,67 pg/mL, *IL-17A* = 4,0 pg/mL, e *VEGF- α* = 10,98 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios observados foram: intra CV: *TNF- α* = 7,8 \pm 0,9%, *IL-1 β* = 6,2 \pm 0,4%, *IL-17A* = 7,5 \pm 1,7% e *VEGF- α* = 6,0 \pm 2,1%; inter CV: *TNF- α* = 9,6 \pm 2,1%, *IL-1 β* = 5,1 \pm 0,6%, *IL-17A* = 6,2 \pm 0,9% e *VEGF- α* = 5,1 \pm 0,7%. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, *TNF- α* (5,0 - 2300 pg/mL), *IL-1 β* (11,72 - 750 pg/mL), *IL-17A* (4,0 - 500 pg/mL) e *VEGF- α* (62,5 - 4000 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras da absorbância de todas as citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/mL.

3.11 Determinação da transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias: *TNF- α* , *IL-1 β* , *VEGF- α* , *IL-17A* e para enzima ONSI

3.11.1 Extração e quantificação do RNA

O RNA total foi extraído de amostras dos pulmões dos camundongos, utilizando-se o Trizol[®], basicamente constituído de uma

mistura dos solventes orgânicos fenol e clorofórmio e do detergente inibidor de nucleases isotiocianato de guanidina.

Inicialmente em um tubo tipo eppendorf com capacidade para 2 mL, foi adicionado 1 mL de Trizol[®], e em seguida 200 mg do tecido pulmonar foi mergulhado e imediatamente picotado com auxílio de aparato cirúrgico livre de RNAses. O material foi homogenizado com auxílio de vórtex por 30 seg. Após 5 min. de incubação à temperatura ambiente (25°C), foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, e o material homogenizado e incubado por mais 3 min. à temperatura ambiente (25°C). Após a centrifugação do material a 12.000 x g (4°C) por 15 min., a fase superior (aquosa) foi transferida para outro tubo tipo eppendorf onde adicionou-se 0,5 mL de isopropanol. Novamente, seguiu-se uma incubação por 10 min. à temperatura ambiente (25°C). Terminada esta etapa, o material foi novamente centrifugado por 10 min. a 12.000 x g (4°C), e o RNA total presente no sedimento foi recuperado.

Para tanto, o sobrenadante foi desprezado e lavado com 1 mL de etanol (70 %, v/v). Finalmente, procedeu-se uma última centrifugação a 7.500 x g (4°C) por 5 min., e novamente o descarte do sobrenadante com posterior secagem do material em estufa (40°C) por 10 min. A seguir, foi adicionado 100 µL de água livre de RNAses (0,01% DEPC – v/v).

Ao final do processo de extração, a determinação da concentração e da pureza do RNA, foram checadas por leitura espectrofotométrica a 260 nm e pela razão da absorbância 260/280 nm, respectivamente.

3.11.2 Reação de transcrição reversa (RT)

As amostras do RNA total foram tratadas com DNase I[®] para eliminar a contaminação com DNA genômico, segundo instruções do fabricante (Invitrogen[®], Carlsbad, Califórnia, EUA). Em seguida, 500 ng de cada amostra foi transferida, para microtubos com capacidade para 200 µL onde adicionou-se 50 µM de oligonucleotídeo (Oligo dT 12-18)[®], 10 mM de dNTPs e 6 µL de água DEPC (0,01%), que após rápida homogenização, foram incubadas por 5 min. a 65°C e acondicionados em banho de gelo por 2 min.

No próximo passo, seguiu-se a adição de 4 µL de solução tampão (First Strand Buffer 5x), 1µL de DTT (0.1 M), 1µL de enzima inibidora de RNAses (Ribolock[®] 20U) e 1µL da enzima Superscript III[®] (200 U) totalizando 20 µL de volume final. Esta solução, foi misturada e incubada por 1 h a 60°C. Terminada a incubação, os microtubos

contendo agora o DNA complementar (cDNA), foram incubados a 70°C por 15 min com a finalidade de inativar as enzimas adicionadas anteriormente. Finalmente, os microtubos foram armazenados em freezer (-20°C) até o momento da realização das reações de PCR.

3.11.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 10 µl de cDNA (reação de transcrição reversa) em um volume final de 50 µl de reação, a qual continha 1 µM de cada oligonucleotídeo: sense e anti-sense correspondentes a cada gene estudado (Tabela 1), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 2 mM de MgCl₂ e 5 µl de tampão (10x PCR Buffer livre de Mg⁺⁺). A reação de PCR foi realizada em quatro etapas: 1) Incubação a 95°C durante 5 min.; 2) 30 a 38 ciclos de amplificação (45 seg. a 95°C, 45 seg. na temperatura específica de cada oligonucleotídeos e 45 seg. a 72°C) (Tabela 1); 3) 7 min. de incubação a 72°C e 4) incubação à 4°C por tempo indeterminado. A sequência dos iniciadores específicos para cada gene foi definida com base no programa Primer 3 (versão 0.4.0), com a finalidade de amplificar uma região gênica única (Tabela 1).

Como controle positivo de amplificação gênica, foram utilizados iniciadores que amplificam o gene da β-actina de expressão constitutiva. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos contendo água como amostra.

Após terminadas as reações de PCR, 9 µl de cada amostra correspondente aos grupos estudados foram misturados a 1 µL de tampão de corrida (*Gel loading buffer* 10 x) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) adicionado de 1% de brometo de etídeo (v/v).

A leitura do gel foi realizada com auxílio de aparelho transiluminador Photo-Capt System® (Vilber-Lourmat, EUA), utilizando-se como software o Photo-Capt image versão 12.4 para o Windows®.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos (iniciadores) e condições usadas nas reações de RT-PCR.

Gene	Iniciadores	Produto de amplificação (pb.)	Ciclos de amplificação	Temp. (°C) de desnaturação	Temp. (°C) de hibridização	Temp. (°C) de extensão	Registro no GenBank
β -actina	CCAACCGTGAAAAGATGACC GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC	606	30	95	52	72	BC138614.1
TNF- α	CTGGGACAGTGACCTGGACT GCACCTCAGGGAAGAGTCTG	204	36	95	50	72	BC137720.1
IL-1 β	CAGGCAGGCAGTATCACTCA AGGCCACAGGTATTTTGTCTG	350	35	95	53	72	BC11437.1
VEGF- α	ACCCGTGACTGAGGTTTGAC TTTCTTGCCTTTTCGTTTT	199	36	95	56	72	NC000083.5
IL-17A	TCTCTGATGCTGTTGCTGCT CGTGGAACGGTTGAGGTAGT	195	38	95	48	72	BC119309.1

3.12 Determinação da atividade da enzima catalase

A determinação da atividade da enzima catalase, foi realizada utilizando-se o sangue total dos camundongos, segundo metodologia descrita por AEBI (1984). Esta reação baseia-se na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (dissolvido em PBS: mmol: NaCl 137, KCl e tampão fosfato 10) na presença da enzima CAT presente no sangue. A atividade da CAT foi determinada pela mudança nas absorvâncias a cada 30 seg., durante 3 min. a 240 nm utilizando-se espectrofotômetro UV/visível (CGB-916, GCB Scientific Equipment, Dadenong, Austrália). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em mmol de CAT/min/mL.

3.13 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da SOD no sangue total foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Mirsa e Fridovich (1972) modificado por Boveris e colaboradores (1983). Esta reação baseia-se na oxidação da adrenalina, por mudança de pH 2,0 para pH 10,0, que gera o ânion superóxido a partir do sistema xantina/xantina oxidase e produz um cromóforo róseo, o adrenocromo. Quando a amostra de sangue foi colocada na cubeta, a enzima (SOD) presente nesta alíquota diminuiu sua formação. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina (50 mM, pH 10,2), foram adicionados 50 µL de adrenalina (60 mM, mantida em pH 2,0 com gelo). A velocidade inicial de formação do adenocromo foi monitorada durante 100 seg. a partir do início da reação, com acréscimo de absorvância a cada intervalo de 15 seg. em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar a alíquota da amostra (20 µL). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas com 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (U SOD/mL) foram expressos em termos de atividade da enzima, sendo que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (MISRA e FRIDOVICH, 1972). As amostras foram tratadas com uma mistura de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), para se retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

3.14 Determinação da atividade da glutathione peroxidase

Para a determinação da atividade da GPx no sangue total, foi utilizado o método descrito por Flohé e Gunzler (1984). Este método baseia-se em dismutar o tBuOOH (tert-butilhidroperóxido) pela oxidação da GSH (glutathione reduzida) e formação de GSSG (Glutathione oxidada). Esta oxidação é catalizada pela GPx, resultando em decréscimo de absorvância, verificada a 340 nm, com auxílio de espectrofotômetro UV/visível (CGB-916, GCB Scientific Equipment, Dadenong, Austrália). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores foram expressos em $\mu\text{mol GPx}/\text{min}/\text{mL}$. Neste protocolo, foi adicionado KCN (50 mM) para evitar a avaliação da atividade da enzima decorrente da oxidação da hemoglobina presente nos lisados (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

3.15 Determinação da atividade da glutathione S-transferase

A atividade da GST foi determinada no sangue total dos camundongos, segundo metodologia descrita por Habig e colaboradores (1976). Esta técnica tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), como substrato, para que a enzima GST, presente na amostra, juntamente com a GSH, promove a conjugação CDNB-GSH. Esta reação foi monitorada a 340 nm por 60 seg. em espectrofotômetro UV/visível (CGB-916, GCB Scientific Equipment, Dadenong, Austrália). As análises foram realizadas em duplicata e os valores expressos em $\mu\text{mol GST}/\text{min}/\text{mL}$. Os hemolisados muito concentrados foram diluídos para evitar densidades ópticas elevadas, o que poderia interferir na avaliação da cinética enzimática (HABIG et al., 1976).

3.16 Determinação das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada nas amostras do lavado pleural, pela detecção dos derivados de seus produtos de oxidação, e de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BIRD e DRAPER, 1984). Neste protocolo, os produtos da peroxidação lipídica reagem com o ácido tiobarbitúrico e produzem uma base de Schiff de coloração rosa que foi medida espectrofotometricamente a 535 nm UV/visível (CGB-916, GCB

Scientific Equipment, Dadenong, Austrália). As concentrações de TBARS foram expressas em mmol TBARS/mL.

3.17 Protocolo Experimental

Para investigar o efeito do Micofenolato de mofetila sobre os parâmetros inflamatórios, realizaram-se curvas dose e tempo-resposta.

No estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses do MMF (1 - 200 mg/kg, v.o.) e o processo inflamatório foi analisado 4 h e 48 h após a administração da carragenina.

No estudo da curva tempo-resposta, após escolha da menor dose capaz de reduzir significativamente a migração de leucócitos e a exsudação para a cavidade pleural, os animais foram tratados previamente e com uma única dose de MMF, em diferentes períodos de tempo (0,5 - 8 h) e a inflamação foi novamente analisada 4 h e 48 h após a administração da carragenina.

Para avaliar o efeito do micofenolato de mofetila sobre a exsudação, os animais foram tratados com solução corante Azul de Evans (25 mg/kg, i.v) até 1 hora antes da administração do agente flogístico carragenina.

Após a escolha da melhor dose e tempo de tratamento prévio, pelo qual o MMF inibiu a migração de leucócitos e a exsudação, estudou-se o efeito deste fármaco sobre a atividade da MPO e da ADA, sobre as concentrações dos metabólitos de nitrito e nitrato (NO_x), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-17A* e *VEGF- α* no lavado pleural. Além disso, avaliou-se a atividade do MMF sobre a atividade das enzimas CAT, SOD, GPx, GST, no sangue total, e sobre a transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α* , *IL-1 β* , *VEGF- α* e *IL-17A*) e para a enzima ONSi, nos pulmões. O efeito do MMF sobre estes parâmetros também foi observado 4 h e 48 h após a indução da pleurisia.

Para todos os parâmetros inflamatórios, foram estudados paralelamente grupos de animais tratados com: 1) somente com solução salina estéril (NaCl 0,9%) (grupo-controle negativo), 2) somente com carragenina 1% (grupo-controle positivo), 3) dexametasona (0,5 mg/Kg, i.p.) + Cg e 4) ibuprofeno (30 mg/Kg, v.o.) + Cg. Estes últimos grupos foram utilizados para compararmos o efeito do MMF com fármacos anti-inflamatórios.

3.13 Fármacos e Reagentes

Neste estudo foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: Micofenolato de mofetila (Cell-Cept®, Roche, Milão, Itália), Dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), ácido 2-tiobarbitúrico, ácido tartárico (sal potássico), azida sódica, Carragenina- λ (grau IV), citocromo-c, CDNB (1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno), cloreto de vanádio III, DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético), dodecil sulfato de sódio, etanol, glutationa redutase, L-glutationa reduzida, hidróxido de sódio, Ibuprofeno, Indometacina, mieloperoxidase de neutrófilos humanos, NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido), o-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina), sulfato de cobre (pentahidratado), sulfanilamida, *tert*-butil hidroperóxido (t-BuOOH), xantina, xantina oxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30 %) (Biotech, São Paulo, SP, Brasil), heparina (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), fosfato de sódio, sulfato de zinco (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Líquido de Türk, corante de May-Grünwald (Newprov, São José dos Pinhais, PR, Brasil), corante de Giemsa (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil), azul de Evans (Acros-Organics, Nova Jersey, EUA); dihidrocloro de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Merck, Darmstadt, Bundesland, Alemanha). Kits de enzima-imunoenensaio (ELISA) para quantificação de *TNF- α* de camundongos (BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA), *IL-1 β* de camundongos, *VEGF- α* de camundongos (IBL: Immunobiological laboratories Co. Ltd., Fujioka, Gunma, Japão), e *IL-17A* de camundongos (eBioscience Inc., São Diego, CA, EUA), iniciadores para reação de cadeia da polimerase (PCR), brometo de etídio, Trizol[®], Superscript III[®], Oligo-dT (12-18)[®], dNTPs e DNase grade I[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), RevertAid[®] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit e Ribolock[®] (Fermentas, Burlington, Canadá), agarose grau PCR (BioAmerica Inc., Miami, FL, EUA). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.14 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros inflamatórios e do estresse oxidativo estudados, incluindo migração celular, exsudação, atividade das enzimas: MPO, ADA, CAT, SOD, GPx, GST e concentrações de

nitrito e nitrato (NO_x), TBARS, *TNF- α* , *IL-1 β* , *VEGF- α* , *IL-17A*, e a transcrição do mRNA para as mesmas citocinas, foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram analisados utilizando o programa de estatística GraphPad Prism[®] versão 3.00 (San Diego, Califórnia, EUA). Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e os grupos tratados com o fármaco MMF ou os de referência (Dexa ou Ibu), foram realizados por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico bicaudal de duas vias), complementado pelos testes pos-hoc de Dunnett. Quando necessário, utilizou-se o teste *t* de Student (não-pareado) e o teste de correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados indicativos de diferenças significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do efeito anti-inflamatório do micofenolato de mofetila

4.1.1 Efeito do micofenolato de mofetila sobre a contagem total e diferencial de leucócitos e exsudação

Na pleurisia induzida pela Cg 4 h, o MMF nas doses de 100 e 200 mg/kg, v.o., administrado 0,5 h antes da Cg, inibiu a migração de leucócitos para a cavidade pleural (% de inibição: 100 mg/kg: $51,7 \pm 3,4\%$ e 200 mg/kg: $52,6 \pm 11,1\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 3A). Esta inibição ocorreu às custas da inibição do influxo de leucócitos do tipo polimorfonucleares (% de inibição: 100 mg/kg: $60,9 \pm 3,3\%$ e 200 mg/kg: $63,4 \pm 8,5\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 3B).

Além disso, o MMF nestas mesmas doses 100 e 200 mg/kg, foi capaz de inibir significativamente a exsudação (% de inibição: 100 mg/kg: $25,7 \pm 2,7\%$ e 200 mg/kg: $24,7 \pm 2,5\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 3C).

No estudo da curva tempo-resposta (0,5 h a 8 h), observou-se que o MMF somente foi efetivo em inibir os leucócitos e a exsudação quando foi administrado no período de tratamento prévio de 0,5 h ($P < 0,01$) (Resultados não demonstrados).

Na segunda fase (48 h) da pleurisia o MMF administrado 0,5 h antes da indução da inflamação induzida pela carragenina nas doses de 100 e 200 mg/kg, v.o., inibiu significativamente a migração leucocitária (% de inibição: 100 mg/kg: $59,8 \pm 5,8\%$ e 200 mg/kg: $63,0 \pm 7,8\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 4A). Esta inibição ocorreu às custas da inibição de mononucleares (% de inibição: 100 mg/kg: $76,1 \pm 3,1\%$ e 200 mg/kg: $75,7 \pm 5,6\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 4B). Nestas mesmas condições experimentais este fármaco também inibiu a exsudação (% de inibição: 100 mg/kg: $51,6 \pm 11,7\%$ e 200 mg/kg: $46,0 \pm 3,5$) ($P < 0,01$) (Fig. 4C).

No estudo da curva tempo resposta, o MMF na dose de 100 mg/kg, v.o., foi capaz de inibir estes mesmos parâmetros inflamatórios, somente quando administrado no período de tratamento prévio de 0,5 h antes da Cg 48 h ($P < 0,01$) (Resultados não demonstrados).

Os fármacos de referência dexametasona e o ibuprofeno inibiram significativamente todos os parâmetros inflamatórios analisados, em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h) ($P < 0,01$) (Figs. 3 e 4).

A partir do estudo das curvas dose e tempo-resposta na primeira (4 h) e na segunda (48 h) fases da resposta inflamatória induzida pela Cg, escolheu-se a dose de MMF na dose de 100 mg/kg, v.o., administrado 0,5 h antes da Cg, para o estudo dos demais parâmetros

inflamatórios (atividade das enzimas MPO, ADA, CAT, SOD, GPx e GST, as concentrações de ON_x e TBARS e a transcrição do mRNA do: TNF- α , IL-1 β , VEGF- α , IL-17A e ONSi).

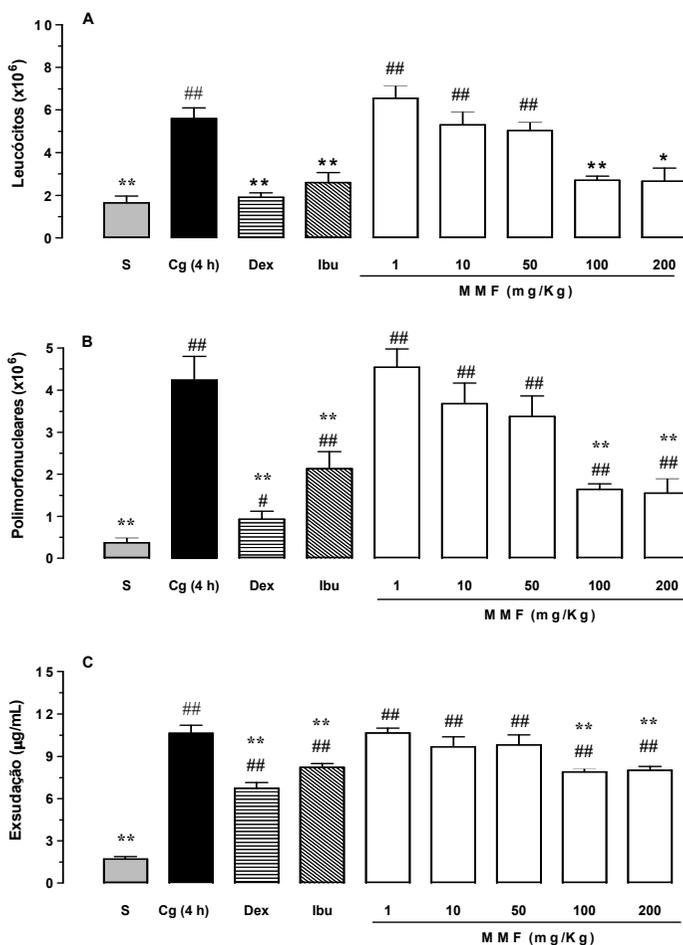


Figura 3: Efeito do Micofenolato de mofetila (MMF) (1 - 200 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h, em camundongos. Efeito do MMF sobre: A) Leucócitos, B) Polimorfonucleares e C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

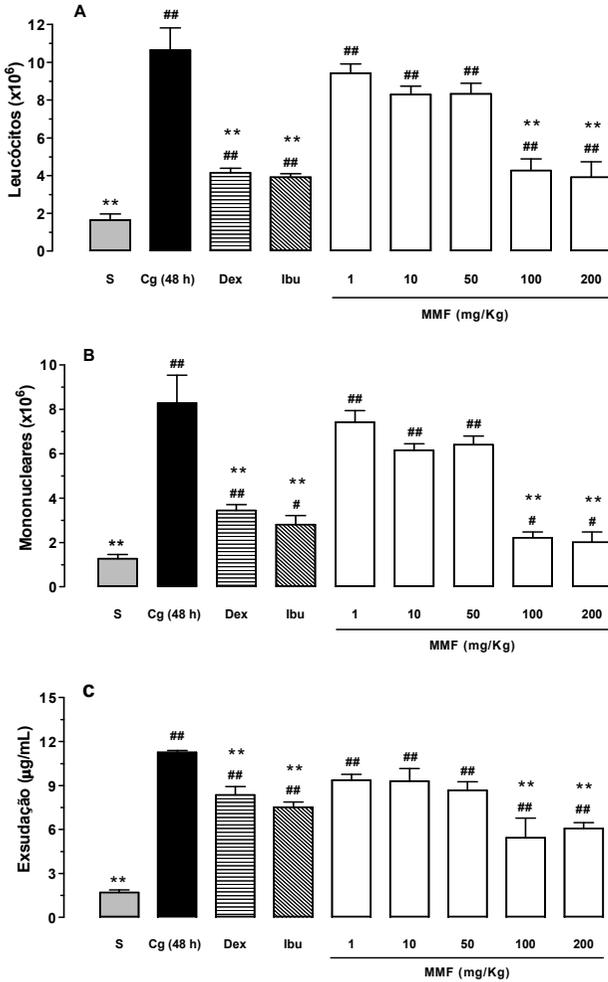


Figura 4: Efeito do Micofenolato de mofetila (MMF) (1 - 200 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h, em camundongos. Efeito do MMF sobre: A) Leucócitos, B) Mononucleares e C) Exsudação. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

4.1.2 Efeito do MMF sobre a atividade da enzima mieloperoxidase

O MMF na dose de 100 mg/kg, v.o. administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia inibiu significativamente a atividade da MPO, na pleurisia 4 h e 48 h (% de inibição: 4 h: $59,3 \pm 12,2\%$ e 48 h: $32,2 \pm 10,4\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 5A e B).

A dexametasona e o ibuprofeno também reduziram significativamente a atividade da enzima MPO em ambas as fases da pleurisia ($P < 0,05$) (Fig. 5A e B).

4.1.3 Efeito do MMF sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase

O MMF (100 mg/kg, v.o.) inibiu também a atividade da ADA (% de inibição: 4 h: $52,1 \pm 4,6\%$ e % de inibição: 48 h: $74,1 \pm 6,1\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 6A e B).

A dexametasona e o ibuprofeno reduziram significativamente, a atividade da ADA em ambas as fases da inflamação induzida pela carragenina ($P < 0,05$) (Fig. 6A e B).

4.1.4 Efeito do MMF sobre as concentrações de nitrito e nitrato

O MMF (100 mg/kg, v.o.) inibiu as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x) nas duas fases (4 h e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina (% de inibição: 4 h: $45,4 \pm 5,5\%$ e 48 h: $50,7 \pm 3,2\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 7A e B).

A dexametasona e o ibuprofeno também inibiram significativamente este mesmo mediador inflamatório ($P < 0,01$) (Fig. 7A e B).

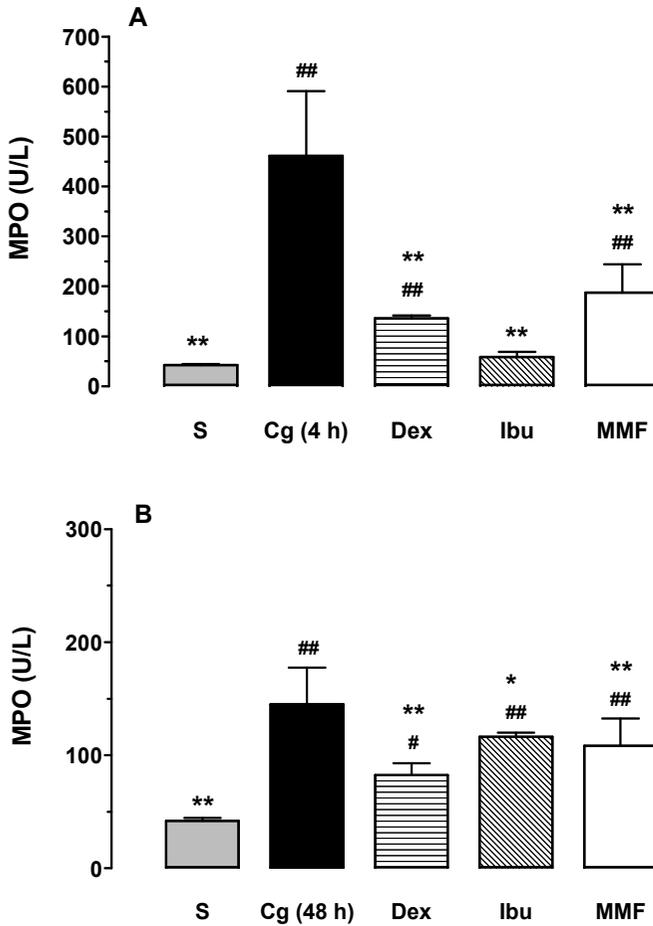


Figura 5: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

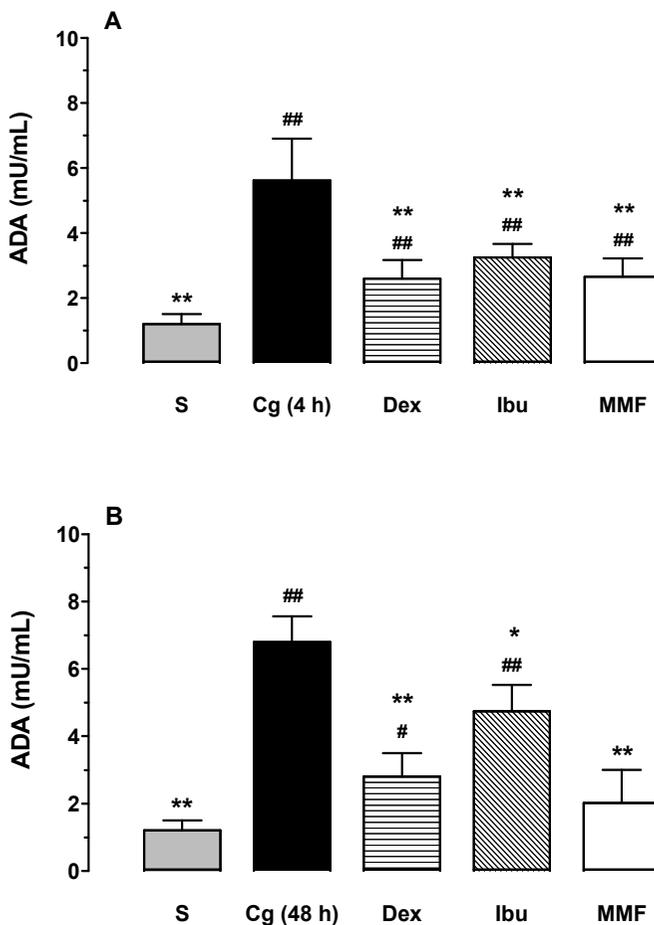


Figura 6: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase (ADA). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

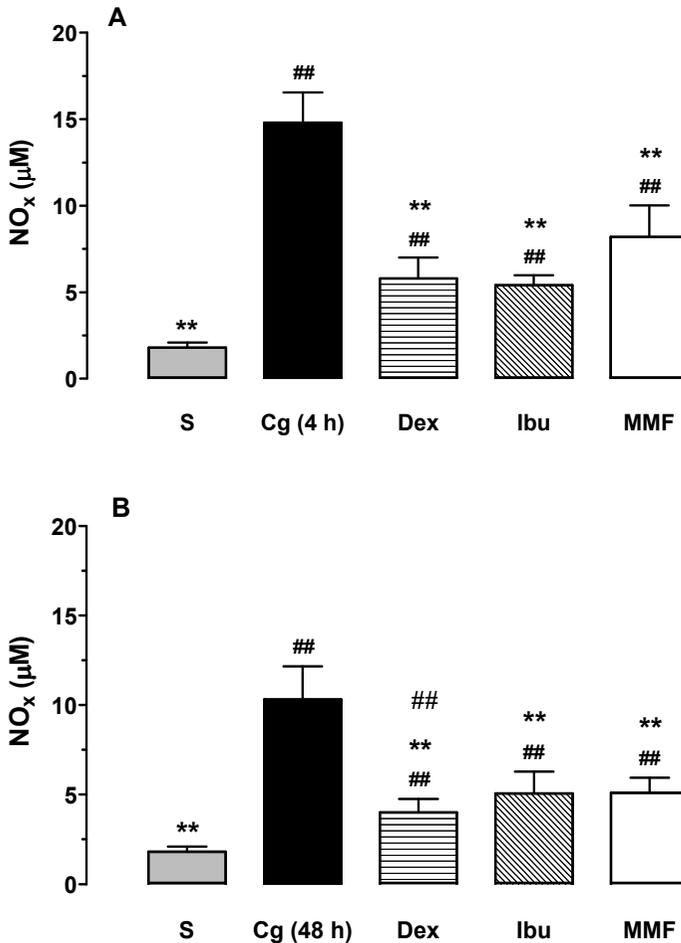


Figura 7: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre concentrações de nitrito e nitrato (NO_x). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média ± e.p.m. (*P < 0,05 e **P < 0,01 em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. #P < 0,05 e ##P < 0,01 diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

4.1.5 Efeito do MMF sobre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 β , VEGF- α e IL-17A

O tratamento dos animais com o MMF (100 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente as concentrações de TNF- α , IL-1 β , VEGF- α e IL-17A nas duas fases da resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos. (% de inibição: TNF- α 4 h: $51,1 \pm 9,3\%$ e 48 h: $77,4 \pm 5,1\%$ ($P < 0,01$), IL-1 β 4 h: $39,6 \pm 3,8\%$ e 48 h: $63,9 \pm 8,3\%$ ($P < 0,01$), VEGF- α 4 h: $29,4 \pm 2,2\%$ e 48 h: $51,1 \pm 7,3\%$ ($P < 0,01$) e da IL-17A 4 h: $42,8 \pm 1,7\%$ e 48 h: $32,1 \pm 10,9\%$) ($P < 0,01$) (Fig. 8, 9, 10 e 11). Os fármacos de referência dexametasona e o ibuprofeno também inibiram significativamente as concentrações destas mesmas citocinas ($P < 0,01$) (Fig. 8, 9, 10 e 11).

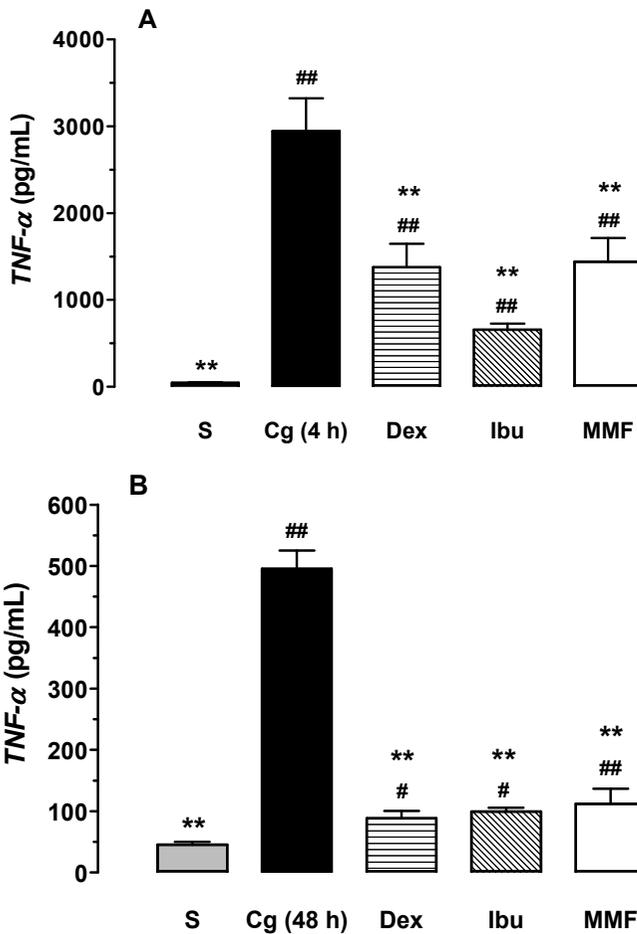


Figura 8: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre as concentrações da citocina fator de necrose tumoral-alfa (*TNF- α*). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

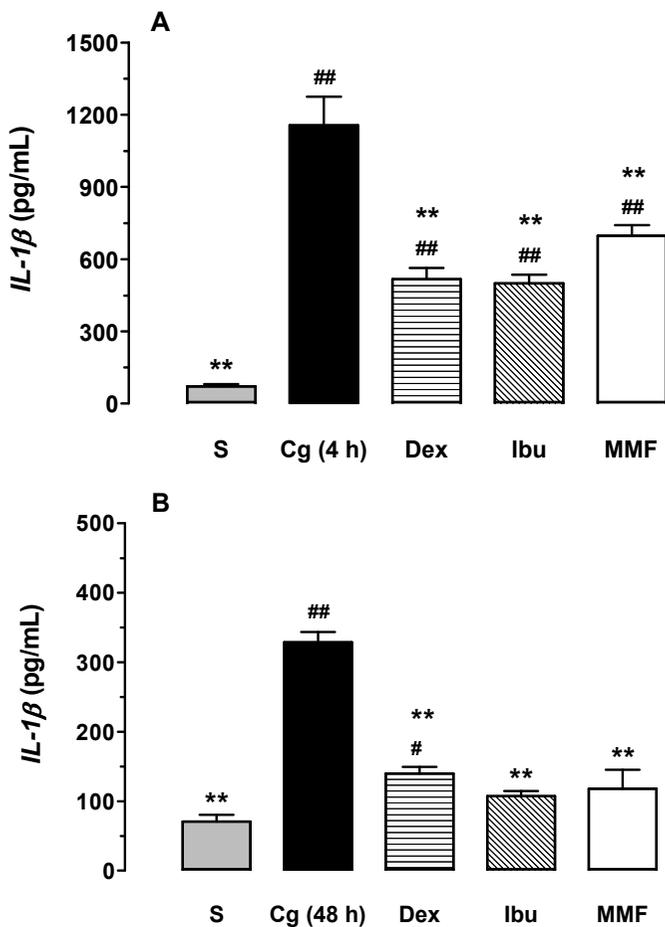


Figura 9: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre as concentrações da citocina interleucina-1 beta ($IL-1\beta$). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

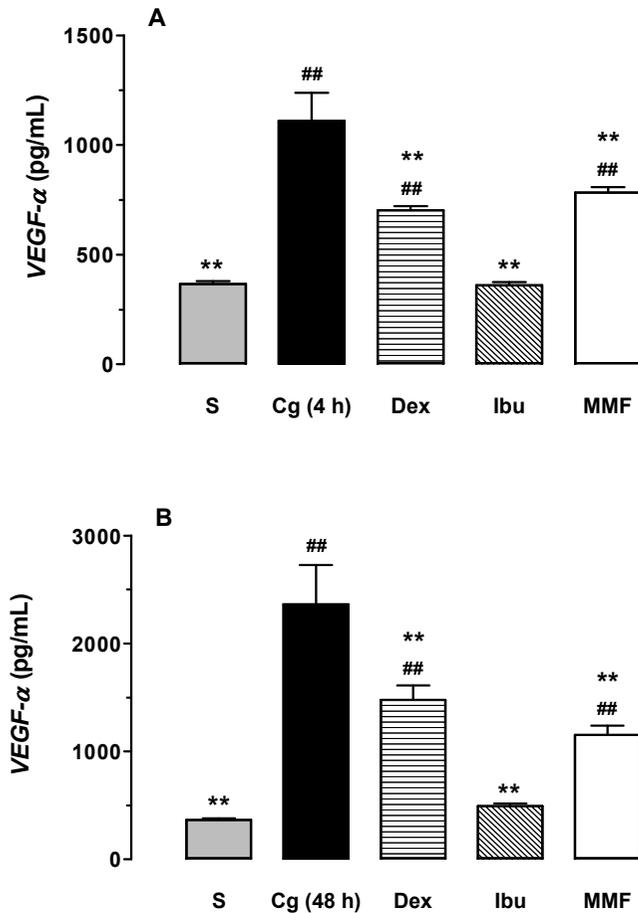


Figura 10: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre as concentrações da citocina fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF- α*). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

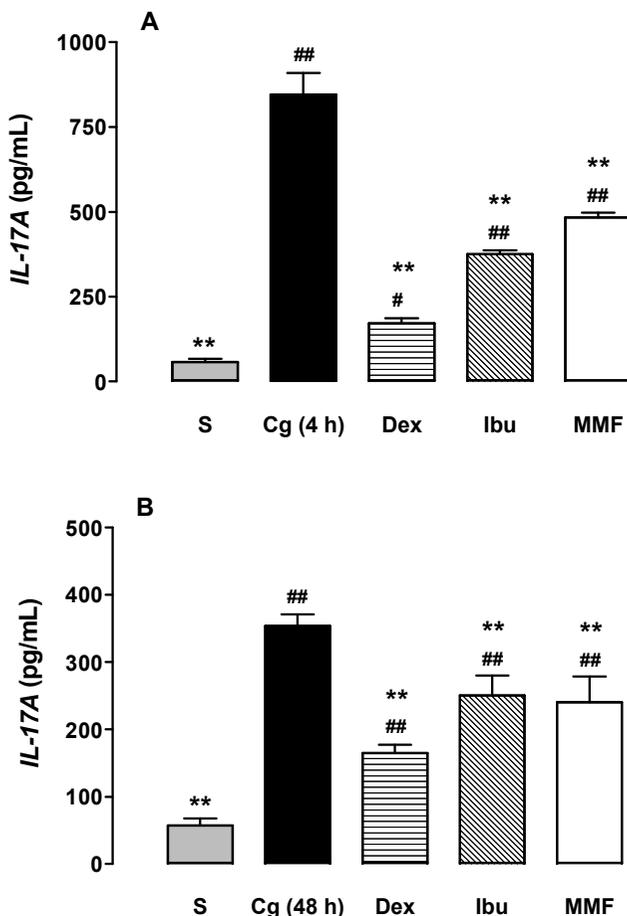


Figura 11: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre as concentrações da citocina interleucina 17A (*IL-17A*). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. ## $P < 0,05$ e ### $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

4.1.6 Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA das citocinas pró-inflamatórias: $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $VEGF-\alpha$ e $IL-17A$

Em ambas as fases (4 h e 48 h) do processo inflamatório induzido pela carragenina, o MMF (100 mg/kg) reduziu de forma significativa a transcrição do mRNA (% de inibição) do $TNF-\alpha$ 4 h: $63,0 \pm 1,6\%$ e 48 h: $39,6 \pm 3,7\%$ ($P < 0,01$) (Fig. 12A e B), da $IL-1\beta$ 4 h: $53,8 \pm 1,6\%$ e 48 h: $62,7 \pm 1,8\%$ ($P < 0,01$) (Fig. 13A e B), do $VEGF-\alpha$ 4 h: $40,3 \pm 2,6\%$ e 48 h: $56,8 \pm 3,2\%$ ($P < 0,01$) (Fig. 14A e B) e da $IL-17A$ 4 h: $58,4 \pm 4,0\%$ e 48 h: $46,5 \pm 4,8\%$ ($P < 0,01$) (Fig. 15A e B). O tratamento prévio com os fármacos de referência (Dex e Ibu), também causaram redução na transcrição do mRNA de todas as citocinas analisadas em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h) ($P < 0,05$) (Fig. 12, 13, 14 e 15).

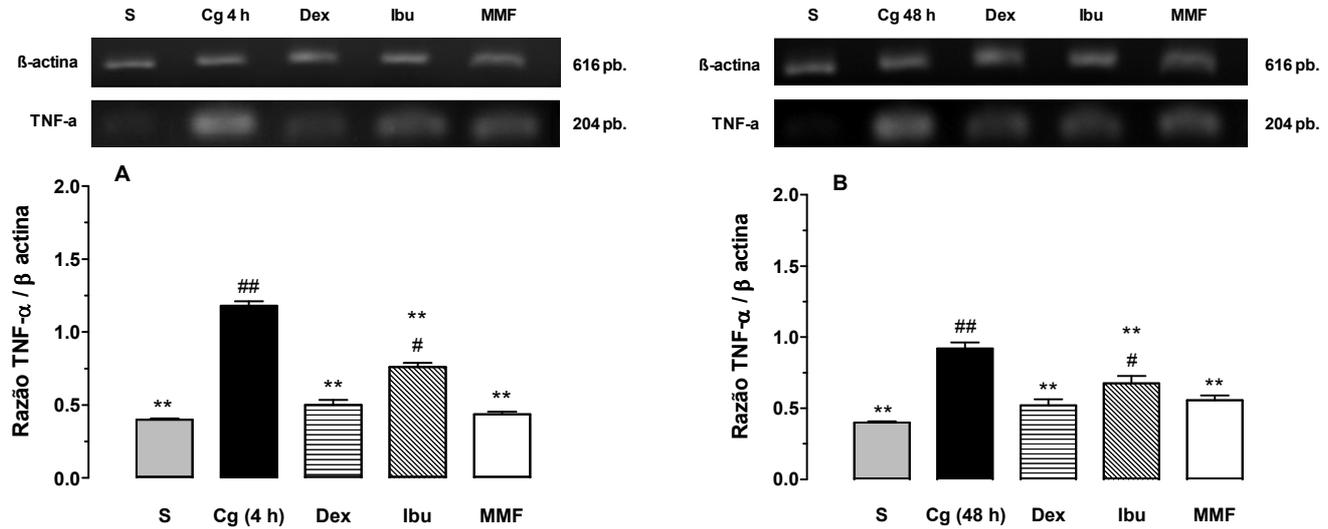


Figura 12: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a transcrição do mRNA para a citocina *TNF- α* . A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo controle positivo (carragenina) e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados). (N = 5 animais). *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o mRNA do *TNF- α* (RT-PCT) em gel de agarose corados com brometo de etídeo.

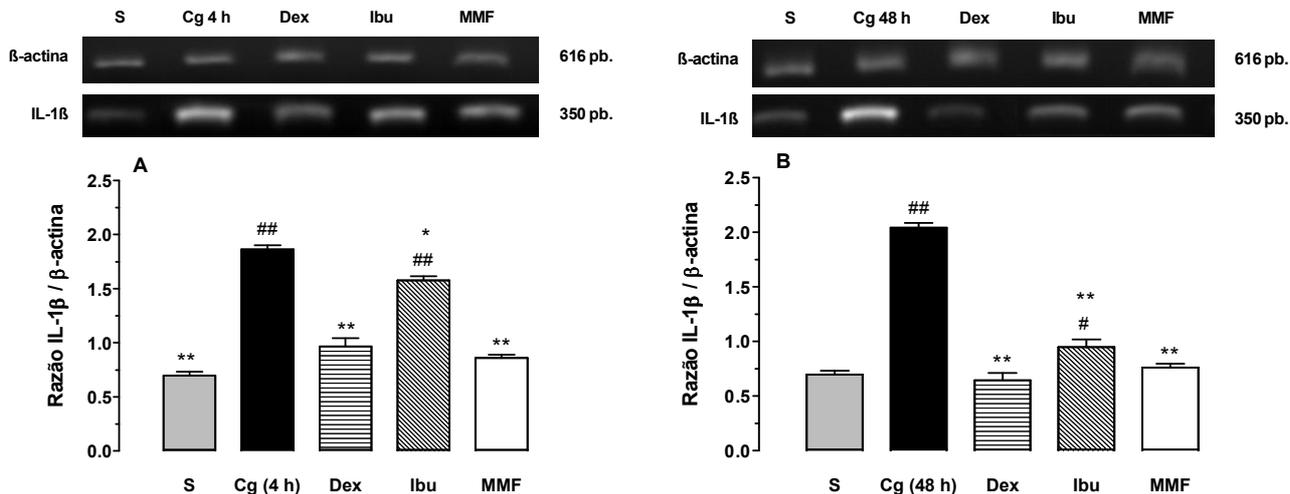


Figura 13: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a transcrição do mRNA para a citocina *IL-1 β* . A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo controle positivo (carragenina) e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados). (N = 5 animais). *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o mRNA do *IL-1 β* (RT-PCT) em gel de agarose corados com brometo de etídeo.

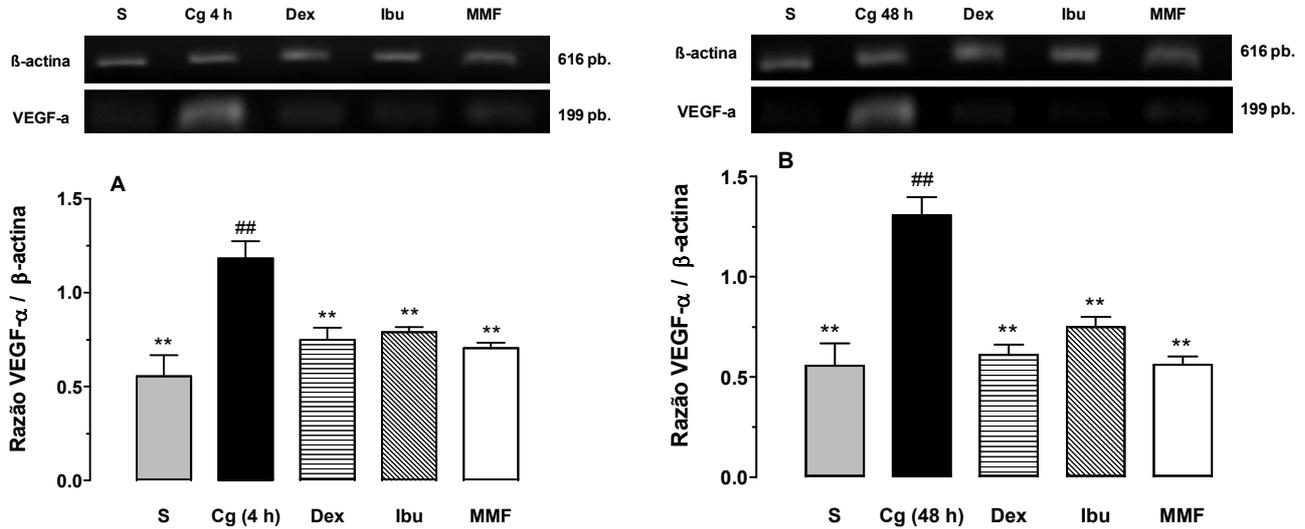


Figura 14: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a transcrição do mRNA para a citocina *VEGF- α* . A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo controle positivo (carragenina) e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados). (N = 5 animais). *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o mRNA do *VEGF- α* (RT-PCT) em gel de agarose corados com brometo de etídeo.

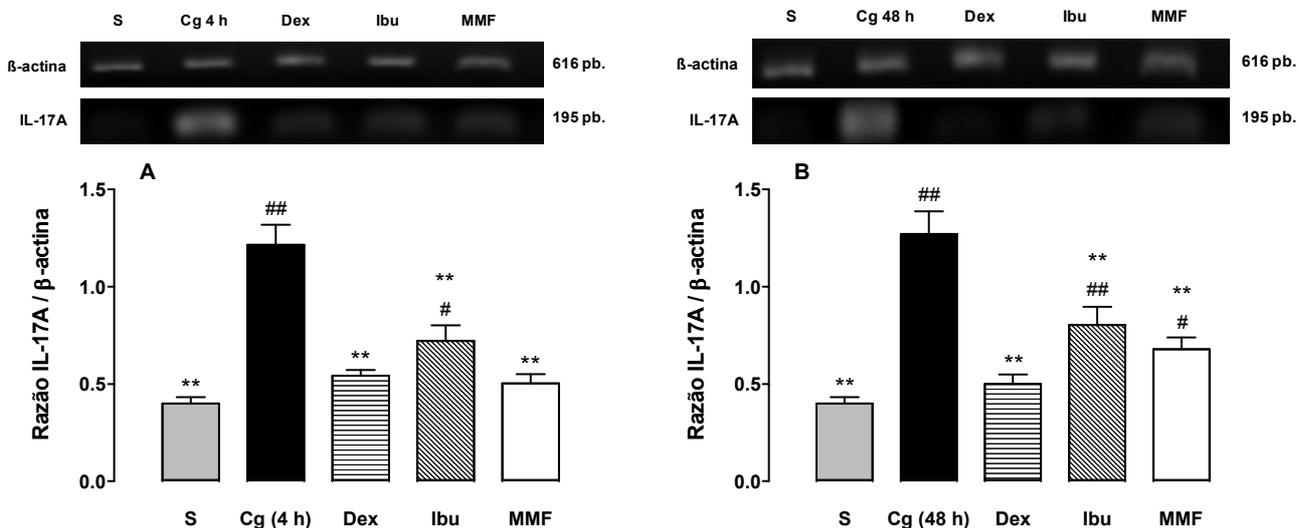


Figura 15: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a transcrição do mRNA para a citocina *IL-17A*. A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo controle positivo (carragenina) e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados). (N = 5 animais). *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o mRNA da *IL-17A* (RT-PCT) em gel de agarose corados com brometo de etídeo.

4.1.7 Efeito do micofenolato de mofetila sobre a transcrição do mRNA para a enzima óxido nítrico sintase induzida

Em ambas as fases (4 h e 48 h) do processo inflamatório induzido pela carragenina, o MMF (100 mg/kg) significativamente reduziu a transcrição do mRNA da enzima ONSi (% de inibição 4 h: $50,7 \pm 1,9\%$ e 48 h: $53,6 \pm 3,1\%$ ($P < 0,01$)) (Fig. 16A e B).

O tratamento prévio com os fármacos de referência (Dex e Ibu), também reduziram a transcrição do mRNA para a enzima ONSi em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h) ($P < 0,01$) (Fig. 16A e B).

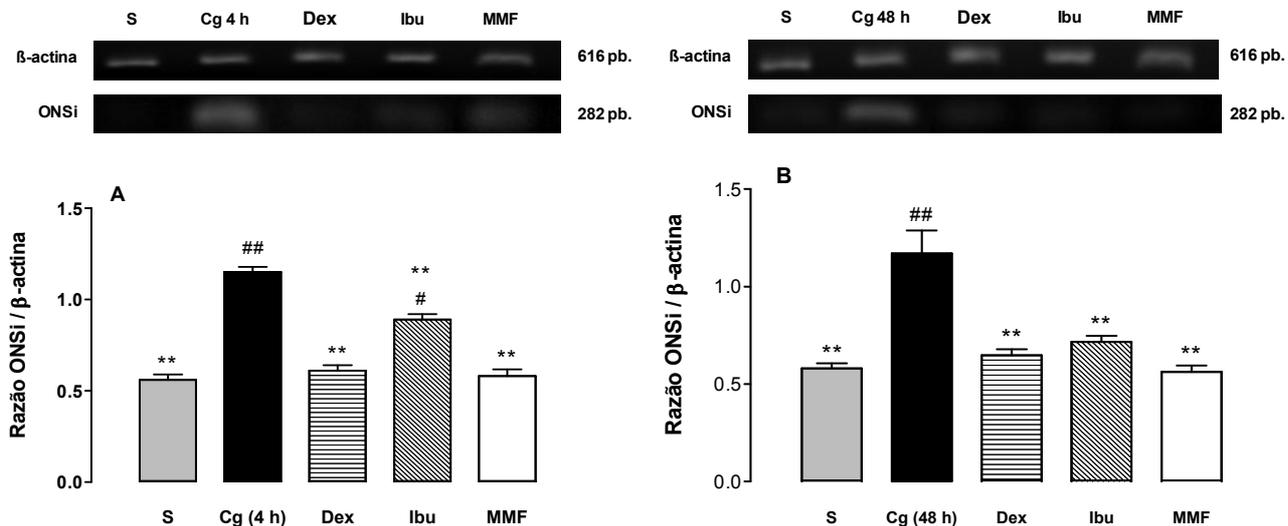


Figura 16: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a transcrição do mRNA para a enzima ONSi. A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo controle positivo (carragenina) e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados). (N = 5 animais). *Inset*, representa a visualização dos produtos de amplificação para o mRNA do ONSi (RT-PCT) em gel de agarose corados com brometo de etídeo.

4.2 Análise do efeito antioxidante do micofenolato de mofetila

4.2.1 Efeito do micofenolato de mofetila sobre a atividade das enzimas antioxidantes: Catalase, Superóxido-dismutase, Glutathione peroxidase e Glutathione S-transferase

O MMF, reduziu significativamente a atividade das CAT, SOD, GPx e GST em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h). (% de inibição: CAT 4 h: $13,2 \pm 1,9\%$ e 48 h: $18,4 \pm 5,5\%$, SOD 4 h: $16,0 \pm 3,4\%$ e 48 h: $18,5 \pm 4,8\%$, GPx 4 h: $32,1 \pm 6,8\%$ e 48 h: $35,1 \pm 0,3\%$ e GST 4 h: $53,7 \pm 3,1\%$ e 48 h: $30,2 \pm 4,6\%$) ($P < 0,05$) (Figs. 17A, 18A, 19A e 20A).

Tanto a Dex quanto o Ibu, também inibiram todas estas enzimas em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h) ($P < 0,05$) (Figs. 17A, 18A, 19A e 20A).

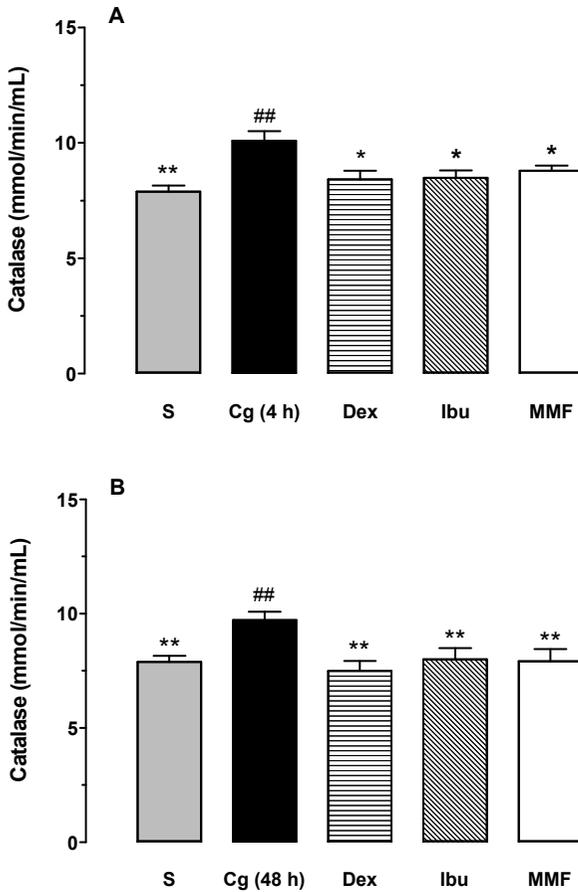


Figura 17: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a atividade da enzima Catalase (CAT). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

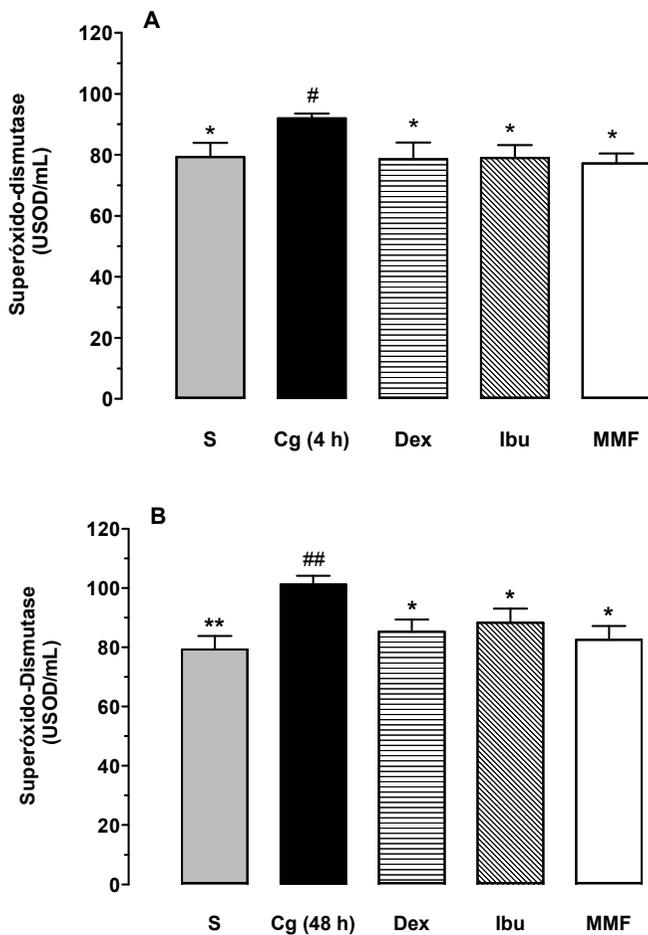


Figura 18: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a atividade da enzima Superóxido-dismutase (SOD). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

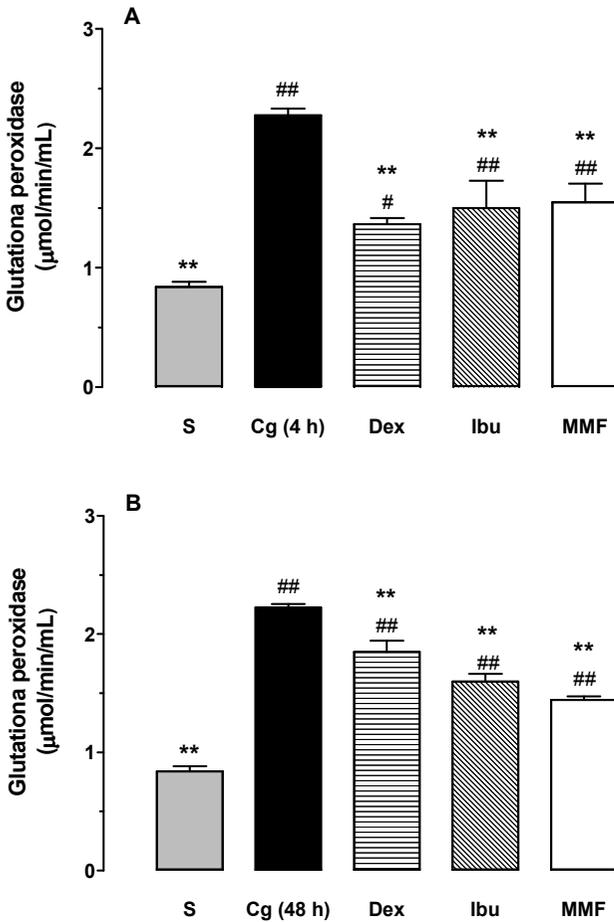


Figura 19: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a atividade da enzima Glutathione peroxidase (GPx). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o. As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

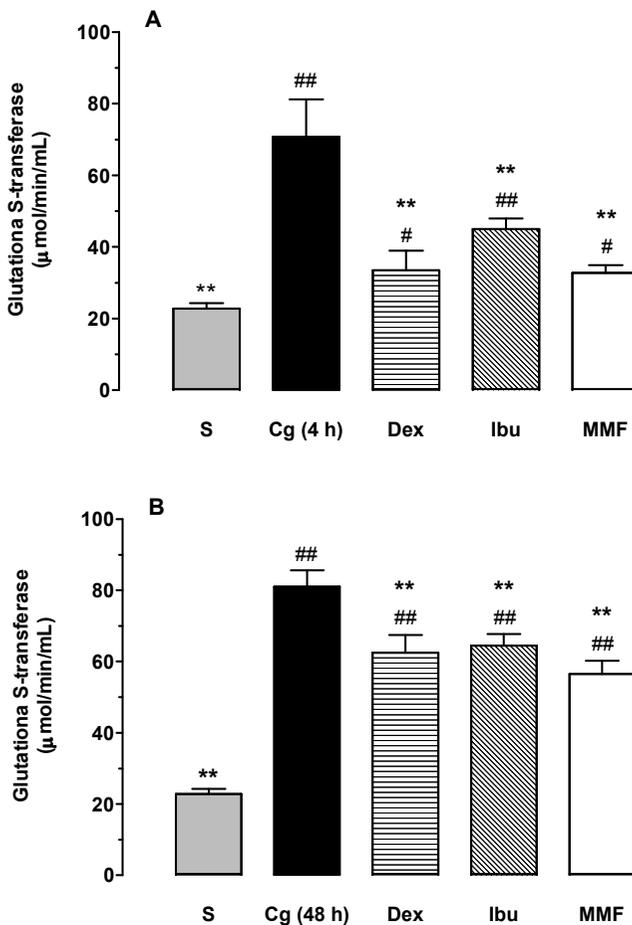


Figura 20: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre a atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. ## $P < 0,05$ e ### $P < 0,01$ diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

4.2.2 Efeito do MMF sobre as concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O micofenolato de mofetila (100 mg/kg), reduziu as concentrações de TBARS na primeira (4 h) e na segunda (48 h) fases do processo inflamatório induzido pela carragenina (% de inibição 4 h: $22,6 \pm 5,6\%$ e 48 h: $22,8 \pm 3,0\%$), ($P < 0,05$) (Figura 21A e B).

De forma similar, os fármacos de referência (Dex e Ibu) também inibiram a geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h) ($P < 0,05$) (Figura 21A e B).

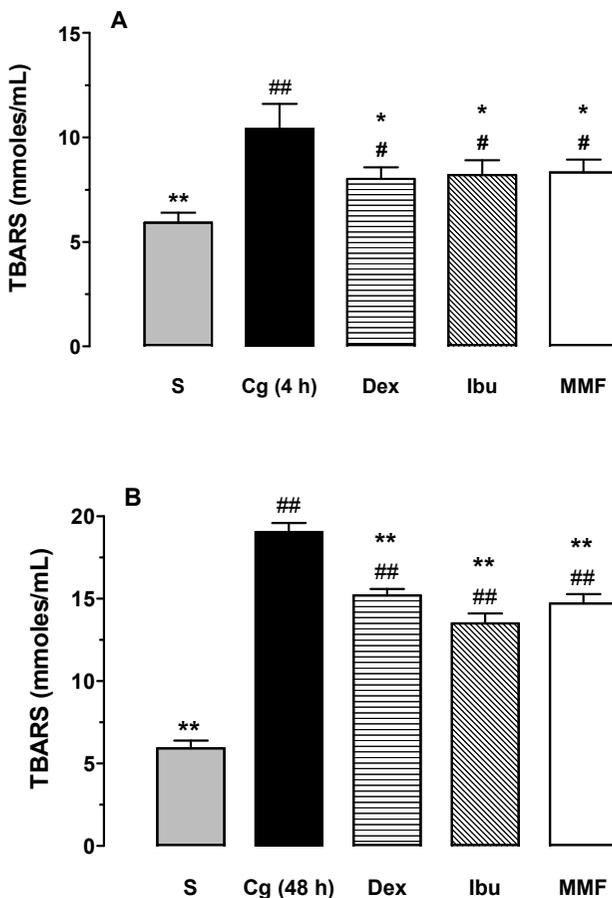


Figura 21: Efeito do micofenolato de mofetila (MMF) sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A) Efeito do MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 4 h. B) Efeito da MMF (100 mg/kg, v.o.) administrado 0,5 h antes da indução da inflamação por carragenina (1%/cav.) na pleurisia 48 h. S = animais tratados somente com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina (1%/cav.), Dex = animais tratados previamente com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), Ibu = animais tratados previamente com ibuprofeno (30 mg/kg, v.o.). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m. (*P < 0,05 e **P < 0,01 em relação ao grupo controle positivo (carragenina), e os demais grupos estudados. #P < 0,05 e ##P < 0,01 diferenças estatísticas entre o grupo negativo (salina) e os demais grupos estudados. (N = 5 animais).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que o MMF possui importante efeito anti-inflamatório no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Esta afirmativa deveu-se à capacidade que o MMF demonstrou em inibir, de forma significativa, a migração de leucócitos para a cavidade pleural em ambas as fases (4 h e 48 h) do processo inflamatório induzido pela carragenina. A inibição dos leucócitos observada na primeira fase (4 h) desta inflamação ocorreu, principalmente, às custas da inibição de polimorfonucleares. Já na segunda fase da pleurisia (48 h) a inibição ocorreu às custas de mononucleares. Resultado similar foi demonstrado por outros pesquisadores, que evidenciaram que o MMF inibiu a migração de polimorfonucleares no parênquima e nos alvéolos pulmonares de ratos, no modelo de isquemia/reperfusão (FARIVAR et al., 2005), e por Saad e colaboradores (2007), que demonstraram redução significativa na migração de mononucleares no parênquima renal de ratos, no modelo de inflamação induzida por cisplatina, quando os ratos foram tratados com MMF (SAAD et al., 2007).

No processo inflamatório, inicialmente ocorre a ativação de células envolvidas na resposta de fase aguda, como os polimorfonucleares. Esta ativação promove a liberação de espécies reativas do oxigênio (EROs), tais como: peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radicais hidroxila (ZARBOCK e LEY, 2009). Evento similar ocorre posteriormente, com a ativação dos mononucleares, que são as células envolvidas após o reconhecimento inicial do agente lesivo, e no desenvolvimento da resposta imune adquirida presente também nos eventos que ocorrem na inflamação crônica (THOMAS et al., 2008).

Atualmente sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido em diversos processos inflamatórios, agudos e crônicos. Exemplos são as pneumonias e a asma brônquica, pelo qual se observa aumento significativo na peroxidação lipídica (CIENCEWICKI et al., 2008). Além disso, em outras doenças de caráter inflamatório, como o diabetes tipo 1, a aterosclerose e as doenças neurodegenerativas, também observa-se diminuição na capacidade antioxidante do organismo, promovendo desequilíbrio na liberação de EROs e ERNs (LIMÓN-PACHECO e GONSEBATT, 2009). Por este motivo, torna-se importante o controle na produção/liberação de EROs e ERNs, para que ocorra diminuição na severidade e conseqüentemente redução na lesão tecidual.

Neste contexto, sabe-se que a defesa antioxidante exerce papel fundamental nas doenças, e seu envolvimento parece estar diretamente relacionado à severidade, extensão e cronicidade de doenças inflamatórias como por exemplo: a colite ulcerativa, a esclerose múltipla e a doença pulmonar obstrutiva crônica (ROESSNER et al., 2008; VAN HORSSSEN et al., 2010; LIN e THOMAS, 2010). Dentre os componentes da defesa antioxidante, podemos destacar as defesas antioxidantes não-enzimáticas, como os tocoferóis, os carotenóides, o ácido ascórbico, a bilirrubina, e a transferrina, e a defesa antioxidante enzimática com destaque para a SOD, a CAT, a GPx e a GST, que exercem papel fundamental no balanço redox dos processos fisiológicos e inflamatórios, além de controlarem a produção/liberação de EROS e ERNs (YAN et al., 2010).

A SOD foi a primeira enzima antioxidante a ser descrita nas células de mamíferos em 1968, e tem como função principal a metabolização do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (YASUI e BABA, 2006). A CAT é uma hemoproteína citoplasmática, que tem como função principal a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. Seu papel antioxidante principal deve-se ao fato de reduzir o risco de formação de hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio (YAN et al., 2010). A CAT, e a GPx têm como funções principais a redução do peróxido de hidrogênio, e pode ainda reagir com uma variedade de hidroperóxidos de lipídios sendo, portanto, responsável pela proteção da membrana celular que ocorre em lesões causadas pelo estresse oxidativo (IMAI e NAKAGAWA, 2003). Já a GST, é considerada a principal enzima detoxificante da fase 2 de biotransformação (reações de conjugação), desempenha papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. A GST torna os xenobióticos menos tóxicos e mais solúveis em água, o que facilita sua excreção (JANCOVA et al., 2010).

Em nossos experimentos, verificamos que o MMF demonstrou importante atividade antioxidante, uma vez que diminuiu a atividade da SOD, CAT, GPx e GST. Estes resultados do MMF, foram similares àqueles observados para ambos os fármacos anti-inflamatórios de referência, dexametasona e ibuprofeno. Além disso, em ambas as fases da pleurisia (4 e 48 h), observamos correlação positiva entre a inibição do influxo de leucócitos para a cavidade pleural e diminuição na atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e GST. Estes achados estão de acordo com os estudos realizados por KRÖTZ e colaboradores (2007), que demonstraram que o MMF exerceu importante ação antioxidante inibindo

a atividade da NADPH-oxidase endotelial e a geração do radical superóxido, em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). Este efeito foi atribuído à diminuição do estresse oxidativo pela redução na geração de EROs (KRÖTZ et al., 2007). Outro estudo a ser destacado, é o de Van den Branden e colaboradores (2003), que observou diminuição significativa na atividade da CAT e SOD em animais tratados previamente com MMF, no modelo de falência renal induzida pela adriamicina (VAN DEN BRANDEN et al., 2003). Saad e colaboradores (2007) também observaram que ratos tratados com MMF apresentaram diminuição significativa na atividade da GPx e da GSH, no modelo de inflamação renal induzida pela cisplatina, em ratos (SAAD et al., 2007).

Observamos ainda que o MMF foi capaz de restabelecer as atividades das enzimas CAT e SOD aos níveis basais, de forma que a atividade de ambas nos grupos tratados com o MMF foram similares aos observados nos animais não inflamados (controle negativo).

A primeira conseqüência da manutenção do estresse oxidativo e do aumento na geração das espécies reativas é a oxidação de proteínas e de lipídios, esta última também conhecida como peroxidação lipídica (THOMAS et al., 2008). No presente estudo, o tratamento com MMF diminuiu a peroxidação lipídica que foi avaliada indiretamente pela redução nas concentrações de TBARS, além da redução na atividade da MPO.

A MPO é conhecida por gerar espécies reativas, como o ácido hipocloroso que, em grande quantidade, é um forte indutor de lesão lipídica, proteica e do DNA (MALLE et al., 2007). Esta inibição pelo MMF sobre a atividade da MPO e sobre as concentrações de TBARS foram similares aos apresentados pelo fármaco de referência dexametasona ($P < 0.05$). Também verificamos uma correlação positiva no tratamento dos animais com MMF, para a inibição da atividade da MPO e as concentrações de TBARS em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h). Estes resultados, também estão de acordo com outros estudos, que demonstraram que o MMF foi capaz de reduzir as concentrações de TBARS, no modelo de inflamação renal induzida pela doxorubicina (VAN DEN BRANDEN et al., 2003), e por diminuir a atividade da MPO, no modelo de inflamação induzida pela isquemia-reperfusão, em ratos (FARIVAR et al., 2005).

Em estudos clínicos, observou-se ainda que em pacientes com artrite reumatóide e medicados com MMF, houve redução nas concentrações de TBARS observados em amostras de urina e de plasma, o que demonstra diminuição no processo de geração de espécies reativas durante o processo inflamatório na artrite reumatóide (HERRERA et al., 2006). De Cal e colaboradores (2008), demonstraram ainda, em um

estudo de coorte, que pacientes transplantados e em terapia com MMF apresentaram diminuição na concentração de proteínas carboniladas, produtos da ação das espécies reativas sobre as proteínas (DE CAL et al., 2008).

Outro resultado importante e que reforça a atividade anti-inflamatória do MMF verificada em nossos experimentos, foi a redução significativa da exsudação na cavidade pleural de animais inflamados com carragenina, em ambas as fases (4 h e 48 h) da pleurisia (DALMARCO et al., 2009). A exsudação é um dos sinais “cardinais” do processo inflamatório e é resultado da ativação de complexos eventos celulares e vasculares. Dentre eles, podemos destacar a liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina, os leucotrienos e também o ON (SCHIMID-SCHONBEIN, 2006).

O ON é caracterizado como o mais importante fator relaxante derivado do endotélio, e exerce funções autócrinas e parácrinas mantendo o tônus vascular e a permeabilidade microvascular. Os efeitos do óxido nítrico na resposta inflamatória são complexos e envolvem a quimiotaxia de leucócitos e o aumento da permeabilidade vascular (VON KNETHEN et al. 2007). Quando o processo inflamatório é estabelecido, a ONSi é expressa nas células endoteliais e é a principal fonte geradora de ON (LUIKING et al., 2010). Os macrófagos e as células endoteliais estimuladas por citocinas pró-inflamatórias, como o *TNF- α* e a *IL-1 β* , induzem a ativação da enzima ONSi, e conseqüentemente ocorre aumento nas concentrações de ON (VAJDOVICH, 2008).

Além disso, existe uma relação muito estreita entre o ON e a citocina *VEGF- α* , já que ambos estão relacionados ao extravasamento de proteínas plasmáticas e a quimiotaxia celular, durante a resposta inflamatória (WALTER et al., 2008; PAREDI e BARNES, 2009). Além disso, o *VEGF- α* tem papel chave na regulação da neovascularização que ocorre na inflamação. Este mediador é produzido em resposta ao *TNF- α* e a *IL-1 β* , por linfócitos macrófagos, neutrófilos e monócitos (HORIUCHI e WELLER, 1997; TAICHMAN et al., 1997; SZEKANECZ e KOCK, 2007). Estudos têm demonstrado a participação do *VEGF- α* no aumento da permeabilidade vascular. Dentre estes, se destaca o realizado por Lee e colaboradores (2004), que demonstraram que o *VEGF- α* aumentou a permeabilidade vascular, o extravasamento de proteínas plasmáticas e a quimiotaxia celular no pulmão, em modelo de asma alérgica induzida por OVA, em camundongos (LEE et al., 2004).

Em nosso estudo, o MMF foi capaz de atenuar os aumentos nas concentrações de NO_x e de *VEGF- α* , assim como diminuir a transcrição

do mRNA da ONSi e do *VEGF- α* . Os resultados obtidos, em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h), foram similares aos apresentados pelo fármaco de referência dexametasona. Além disso, verificamos correlação positiva entre a redução nas concentrações de NO_x e de *VEGF- α* . Nossos resultados são corroborados por estudos, que revelaram que o MMF foi capaz de diminuir significativamente as concentrações de NO_x e a transcrição do mRNA da ONSi, no modelo experimental de inflamação renal induzida pela cisplatina, e no modelo *in vitro* utilizando-se cultura de células de fibroblastos de ratos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) (MILJKOVIC et al., 2003; SAAD et al., 2007). Além disso, Lee e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição nas concentrações de NO_x , foi associada à inibição nas concentrações de *VEGF- α* , no modelo de lesão pulmonar induzida pela bleomicina em ratos (LEE et al., 2010).

Além do efeito do MMF sobre a citocina *VEGF- α* , em nossos experimentos, este fármaco inibiu de forma significativa, outras citocinas consideradas pró-inflamatórias como o *TNF- α* , a *IL-1 β* e a *IL-17A*. Os resultados obtidos sobre a inibição das concentrações de *TNF- α* foram similares aos apresentados pelos animais tratados com dexametasona, em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h). Além disso, em ambas as fases da pleurisia (4 h e 48 h) observamos correlação positiva entre a inibição na migração leucocitária para a cavidade pleural causada pelo tratamento dos animais com MMF e a diminuição nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias estudadas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se o *TNF- α* , a *IL-1 β* e mais recentemente a *IL-17*, que possuem papel de destaque em diversas doenças de caráter inflamatório. O *TNF- α* e a *IL-1 β* induzem a produção/liberação de outras citocinas e quimiocinas, a expressão de moléculas de adesão, angiogênese e medeiam efeitos inflamatórios sistêmicos, como a febre, a hipotensão e a neutrofilia (TINCANI et al., 2007).

Os resultados obtidos sobre a inibição das citocinas *TNF- α* , *IL-1 β* e *IL-17A* pelo tratamento dos animais com MMF encontrados em nossos experimentos, estão de acordo com estudos *in vitro*, observados por Jonsson e Carsten (2002) e por Weimer e colaboradores (2003), que demonstraram que o MMF reduziu as concentrações de *TNF- α* e de *IL-1 β* em culturas de macrófagos murinos e de monócitos humanos estimulados com LPS (JONSSON e CARLSTEN, 2002 WEIMER et al., 2003). Estudos *in vivo* também reforçam esta afirmação, como aquele de Yang e colaboradores (2008), que demonstrou que o MMF inibiu as concentrações de *IL-1 β* no modelo de isquemia/reperfusão, em ratos (YANG et al., 2008). Além disso, Lee e colaboradores (2008)

demonstraram que o fármaco MMF diminuiu a inflamação pulmonar, reduzindo as concentrações de *TNF- α* , no modelo de colite induzida pelo ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) (LEE et al., 2008). Yang e colaboradores (2008) demonstraram ainda que o MMF reduziu as concentrações e a transcrição do mRNA do *TNF- α* , da *IL-6* e do *INF- γ* , no modelo de inflamação hepática induzida pelo bacilo de Calmette-Guérin e LPS, em ratos (YANG et al., 2008).

A *IL-17* age como citocina pró-inflamatória principalmente por ser capaz de induzir a liberação de diversas quimiocinas, citocinas, metaloproteínas e peptídeos antimicrobianos por células mesenquimais e mielóides, o que acaba levando ao acúmulo de polimorfonucleares no sítio da resposta inflamatória durante a resposta imune inata e adaptativa (XU e CAO, 2010). Estudos recentes têm demonstrado que a *IL-17* possui papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório em diversas doenças como na doença de Crohn (STROBER et al., 2010), no lúpus eritematoso sistêmico (YAP e LAI, 2010), além da asma brônquica (COSMI et al., 2010).

Os resultados obtidos em animais tratados previamente com MMF, sobre a inibição da *IL-17*, chamam a atenção para a ação do MMF sobre a ativação de linfócitos, principalmente do tipo TH17 que são os principais responsáveis pela liberação de *IL-17A* (AFZALI et al., 2010). Estudos *in vitro* desenvolvidos por Von Vietinghoff e colaboradores (2010) demonstraram que o MMF reduziu a liberação de *IL-17A* em células T humanas e murinas estimuladas pelo fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) (VON VIETINGHOFF et al., 2010).

Sabe-se que, para ocorrer a produção/liberação das citocinas pró-inflamatórias como o *TNF- α* , a *IL-1 β* , o *VEGF- α* e a *IL-17A*, o estímulo inflamatório precisa ser capaz de desencadear a ativação de fatores de transcrição nuclear. Para que este evento ocorra, é necessário a ativação de sinalizadores intracelulares localizados em nível pré-transcricional, como, por exemplo, a cascata das MAPKs. Existe ainda a possibilidade do estímulo inflamatório, atuar diretamente no fator de transcrição nuclear na sua forma inativa, que se localiza no citoplasma das células imunes, tais como o fator ativador de proteína 1 (AP-1) e/ou o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), ativando-o(s) (VALLABHAPURAPU e KARIN, 2009). Neste trabalho, estudamos o efeito do MMF sobre a transcrição do mRNA das citocinas pró-inflamatórias: *TNF- α* , a *IL-1 β* , o *VEGF- α* e a *IL-17A* nos pulmões, os quais são fundamentais para que haja a produção destas citocinas após o estímulo inflamatório, e pudemos verificar que o MMF foi eficaz em reduzir de forma significativa a

transcrição destes mRNAs. Este efeito foi similar ao apresentado pelo fármaco de referência dexametasona, em ambas as fases (4 h e 48 h) do processo inflamatório deflagrado pela carragenina. Além disso, verificamos correlação positiva entre a inibição na migração leucocitária causada pelo tratamento dos animais com MMF e a redução na transcrição do mRNA das citocinas pró-inflamatórias estudadas.

É importante salientar que a análise da transcrição do mRNA para as citocinas pró-inflamatórias, realizada em nossa pesquisa, deu-se a partir de amostras dos pulmões e não do lavado pleural. Este procedimento deveu-se à falta de mRNA viável para a execução do procedimento de transcrição reversa a partir do lavado pleural.

A síntese e liberação das citocinas pró-inflamatórias deve-se principalmente a presença de leucócitos ativados, sejam polimorfonucleares ou mononucleares, no sítio inflamatório. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório já haviam demonstrado presença e ativação destes leucócitos no parênquima pulmonar em ambas as fases (4 h e 48 h) da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos (DALMARCO et al., 2008; DALMARCO e FRODE, 2007).

Uma vez que o MMF apresentou propriedades anti-inflamatória e antioxidante importantes no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, acreditamos ter contribuído de forma significativa para a fortalecer os conhecimentos acerca da ação anti-inflamatória e antioxidante do fármaco MMF. Além disso, por tratar-se de um fármaco já disponível no mercado, justifica-se o seu uso na terapia de doenças de caráter inflamatório agudo ou crônico, nas quais ocorre a participação de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo e que se apresentam refratárias ao tratamento convencional.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, indicam que o MMF é um fármaco que apresenta importantes propriedades anti-inflamatória e antioxidantes avaliadas no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, uma vez que:

- 1) Diminuiu a migração de leucócitos e a exsudação;
- 2) Reduziu a atividade de enzimas inflamatórias, MPO e ADA, relacionadas à ativação de polimorfonucleares e mononucleares, respectivamente;
- 3) Reduziu a atividade de enzimas anti-oxidantes como a: SOD, CAT, GPx e GST, por reduzir a geração de espécies reativas;
- 4) Reduziu o estresse oxidativo, verificado pela diminuição na peroxidação lipídica (TBARS);
- 5) Diminuiu as concentrações de óxido nítrico (ON) e a transcrição do mRNA da enzima óxido nítrico sintase induzida (ONSi);
- 6) Reduziu não somente as concentrações das proteínas formadas (*TNF- α* , *IL-1 β* , *VEGF- α* e *IL-17A*), mas atuou também em nível pré-transcricional, inibindo a transcrição do mRNA destes mediadores.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol**, v.204, p.234-254, 1984.
- AFZALI, B.; MITCHELL, P.; LECHLER, R.I.; JOHN, S.; LOMBARDI, G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. **Clin Exp Immunol**, v.159, n.2, p.120-130, 2010.
- ALLISON, A.C., EUGUI, E.M. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. **Immunol Rev**, v.136, p.5-28, 1993.
- ALLISON, A.C.; EUGUI, E.M. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). **Clin Transplant**, v.10, p.77-84, 1996.
- ALLISON, A.C., EUGUI, E.M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. **Immunopharmacology**, v.47, p.85-118, 2000.
- BATHOORN, E.; LIESKER, J.J.; POSTMA, D.S.; KOËTER, G.H.; VAN DER TOORN, M.; VAN DER HEIDE, S.; ROSS, H.A.; VAN OOSTERHOUT, A.J.; KERSTJENS, H.A. Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v.4, p.101-109, 2009.
- BATRA, J.; CHATTERJEE, R.; GHOSH, B. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): role in asthma pathogenesis. **Indian J Biochem Biophys**, v.44, n.5, p.303-309, 2007.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Meth. Enzymol**, v.90, p.105-110, 1984.

BOVE, P.F.; VAN DER VLIET, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. **Free Radic Biol Med**, v.41, n.4, p.515-527, 2006.

BUDHU, A.; WANG, X.W. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, p.1-17, 2006.

CARTA, S.; CASTELLANI, P.; DELFINO, L.; TASSI, S.; VENÈ, R.; RUBARTELLI, A. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. **J Leukoc Biol**, v.86, n.3, p.549-555, 2009.

CASCÃO, R.; ROSÁRIO, H.S.; FONSECA, J.E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta Reumatol Port**, v.34, n.2B, p.313-326, 2009.

CHAROKOPOS, N.; APOSTOLOPOULOS, N.; KALAPODI, M.; LEOTSINIDIS, M.; KARAMANOS, N.; MOUZAKI, A. Bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease and NF-kappaB. **Curr Med Chem**, v.16, n.7, p.867-883, 2009.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEBERGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v.122, n.3, p.456-468, 2008.

COMHAIR, S.A.; ERZURUM, S.C. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v.12, n.1, p.93-124, 2010.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.2, p.:S53-72, 2010.

CORSINI, E.; DI PAOLA, R.; VIVIANI, B.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; LUCCHI, L.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; CUZZOCREA, S.. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. **Immunology**, v.115, p.253-261, 2005.

COSMI, L.; MAGGI, L.; SANTARLASCI, V.; CAPONE, M.; CARDILICCHIA, E.; FROSALI, F.; QUERCI, V.; ANGELI, R.; MATUCCI, A.; FAMBRINI, M.; LIOTTA, F.; PARRONCHI, P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.1, p.222-230, 2010.

CUZZOCREA, S.; BRUSCOLI, S.; MAZZON, E.; CRISAFULLI, C.; DONATO, V.; DI PAOLA, R.; VELARDI, E.; ESPOSITO, E.; NOCENTINI, G.; RICCARDI, C. Peroxisome proliferator-activated receptor- α contributes to the anti-inflammatory activity of glucocorticoids. **Mol Pharmacol**, v.73, n.2, p.323-337, 2008.

DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v.11, n.5, p.299-306, 2002.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S. Methotrexate inhibits integrin adhesion molecules in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Braz Arch Biol Tech**, v.50, n.5, p.777-784, 2007.

DALMARCO, E.M.; MEDEIROS, Y.S.; FRÖDE, T.S. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNF α and IL-1 beta levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Cell Adh Migr**, v.2, n.4, p.231-235, 2008.

DALMARCO, E.M.; BUDNI, P.; PARISOTTO, E.B.; WILHELM FILHO, D.; FRÖDE, T.S. Antioxidant effects of mycophenolate mofetil

in a murine pleurisy model. **Transpl Immunol**. v.22, n.1-2, p.12-17, 2009.

DE BRITO, F.D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: PHARMACOLOGICAL METHODS IN THE CONTROL OF INFLAMMATION. Dagenham: 1989. p. 173-228.

DE CAL M, SILVA S, CRUZ D, BASSO F, CORRADI V, LENTINI P, NALESSO F, DISSEGNA D, GOEPEL V, CHIARAMONTE S, RONCO C. Oxidative stress and 'monocyte reprogramming' after kidney transplant: a longitudinal study. **Blood Purif**, v.26, n.1, p.105-110, 2008.

FARIVAR, A.S.; MACKINNON-PATTERSON, B.; BARNES, A.D.; MULLIGAN, M.S. The effect of anti-inflammatory properties of mycophenolate mofetil on the development of lung reperfusion injury. **J Heart Lung Transpl**, v.24, n.12, p.2235-2242, 2005.

HERRERA, J.; FERREBUZ, A.; MACGREGOR, E.G.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Mycophenolate mofetil treatment improves hypertension in patients with psoriasis and rheumatoid arthritis. **J Am Soc Nephrol**, v.17, n.(12 Suppl 3) p.S218-225, 2006.

FELTIS, B.N.; WIGNARAJAH, D.; ZHENG, L.; WARD, C.; REID, D.; HARDING, R.; WALTERS, E.H. Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v.173, n.11, p.1201-1207, 2006.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Meth Enzymol**, v.105, p.114-21, 1984.

FREDHOLM, B.B. Adenosine receptors as drug targets. **Exp Cell Res**, v.316, n.8, p. 1284-1288, 2010.

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

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.4, n.3, p.281-286, 2005.

FUJISAWA, T.; VELICHKO, S.; THAI, P.; HUNG, L.Y.; HUANG, F.; WU, R. Regulation of airway MUC5AC expression by IL-1beta and IL-17A; the NF-kappaB paradigm. **J Immunol**, v.183, n.10, p.6236-6243, 2009.

FUKUNAGA, J.; ABE, M.; MURAI, A.; AKITAKE, Y., HOSOKAWA, M., TAKAHASHI, M. Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. **Int Immunopharmacol**, v.7, n.14, p.1852-1861, 2007.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: BERGMAYER HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*, New York: Weinheim: Verlac Chemie, 1984; p.315-323.

GÓRSKA, K.; MASKEY-WARZECZOWSKA, M.; KRENKE, R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Curr Opin Pulm Med**, v.16, n.2, p.89-96, 2010.

GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.B. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**, v.126, n.1, p.131-138, 1982.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem**, v.249, p.7130-7139, 1976.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M.. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.445, p.214-224, 2006.

HEATH, B.C. Chemical pathology of nephrosis induced by an infectious bronchitis virus. **Avian Dis**, v.14, n.1, p.95-106, 1970.

HEMMRICH, K.; KRÖNCKE, K.; SUSCHEK, C.V.; KOLB-BACHOFEN, V.. What sense lies in antisense inhibition of inducible nitric oxide synthase expression? **Nitric Oxide**, v.12, p.183-199, 2005.

HIPPE, A.; HOMEY, B.; MUELLER-HOMEY, A. Chemokines. **Rec Results Cancer Res**, v.180, p.35-50, 2010.

HONG, H.; SUN, J.; CAI, W. Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases. **Free Radic Biol Med**, v.15, n.47, p.684-698, 2009.

HORIUCHI, T.; WELLER, P.F. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin-5. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.17, n.1, p.70-77, 1997.

ICHINOSE, M. Differences of inflammatory mechanisms in asthma and COPD. **Allergol Int**, v.58, n.3, p.307-313, 2009.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radic Biol Med**,; v.34, n.2, p.145-169, 2003.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAIJO, S.; ISHIGAME, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunol Rev**, v.226, p.57-79, 2008.

JANCOVA, P.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v.154, n.2, p.103-116, 2010.

JONSSON, C.A.; CARLSTEN, H. Mycophenolic acid inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses production of pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, and LDH in macrophages. **Cell Immunol**, v.216, n.1-2, p. 93-101, 2002.

KIS-TOTH, K.; TSOKOS, G.C. Dendritic cell function in lupus: Independent contributors or victims of aberrant immune regulation. **Autoimmunity**, v.43, n.2, p.121-30, 2010.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend ou foe. **J Leuk Biol**, v.77, p.1-28, 2005.

KNAPP, S.; FLORQUIN, S.; GOLENBOCK, D.T.; VAN DER POLL, T. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. **J Immunol**, v.176, n.5, p.3189-3195, 2006.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.4, n.4, p.471-479, 2005.

KRAVCHUK, E.A. Free-radical oxidation in the pathogenesis of eye diseases. **Vestn Oftalmol**, v.120, n.5, p.48-51, 2004.

KRÖTZ, F.; KELLER, M.; DERFLINGER, S.; SCHMID, H.; GLOE, T.; BASSERMANN, F.; DUYSER, J.; COHEN, C.D.; SCHUHMANN, C.;

KLAUSS, V.; POHL, U.; STEMPFLE, H.U.; SOHN, H.Y.
Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. **Hypertension**, v.49, n.1, p.201-208, 2007.

LEE, K.S.; KIM, S.R.; PARK, H.S.; JIN, G.Y.; LEE, Y.C.
Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing VEGF expression. **J Allergy Clin Immunol**, v.114, n.5, p.1093-1099, 2004.

LEE, J.; KIM, M.S.; KIM, E.Y.; PARK, H.J.; CHANG, C.Y.; PARK, K.S.; JUNG, D.Y.; KWON, C.H.; JOH, J.W.; KIM, S.J. Mycophenolate mofetil promotes down-regulation of expanded B cells and production of TNF-alpha in an experimental murine model of colitis. **Cytokine**, v.44, n.1, p.49-56, 2008.

LEE, S.H.; JANG, A.S.; KIM, Y.E.; CHA, J.Y.; KIM, T.H.; JUNG, S.; PARK, S.K.; LEE, Y.K.; WON, J.H.; KIM, Y.H.; PARK, C.S.
Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. **Respir Res**, v.8, p.11-16, 2010.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutat Res**, v.674, n.1-2, p.137-147, 2009.

LIN, J.L.; THOMAS, P.S. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease. **COPD**, v.7, n.4, p.291-306, 2010.

LUIKING, Y.C.; ENGELEN, M.P.; DEUTZ, N.E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.13, n.1, p.97-104, 2010.

MA, M.H.; SCOTT, I.C.; KINGSLEY, G.H.; SCOTT, D.L. Remission in early rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v.37, n.7, p.1444-1453, 2010.

MAIONE, F.; PASCHALIDIS, N.; MASCOLO, N.; DUFTON, N.; PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Interleukin 17 sustains rather than induces inflammation. **Biochem Pharmacol**, v.77, n.5, p.878-887, 2009.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J Pharmacol**, v.152, n.6, p.838-854, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, p.428-435, 2008.

MILJKOVIC, D.J.; CVETKOVIC, I.; STOSIC-GRUJICIC, S.; TRAJKOVIC, V. Mycophenolic acid inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in rodent fibroblasts. **Clin Exp Immunol**, v.132, n.2, p.239-246, 2003.

MILLS, K.H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. **Eur J Immunol**, v.38, n.10, p.2636-2649, 2008.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v.5, n.1, p.62-71, 2001.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v.247, n.10, p.3170-3175, 1972.

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and asthma. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v.19, n.5, p.340-354, 2009.

NAGARKAR, D.R.; BOWMAN, E.R.; SCHNEIDER, D.; WANG, Q.; SHIM, J.; ZHAO, Y.; LINN, M.J.; MCHENRY, C.L.; GOSANGI, B.; BENTLEY, J.K.; TSAI, W.C.; SAJJAN, U.S.; LUKACS, N.W.; HERSHENSON, M.B. Rhinovirus infection of allergen-sensitized and -challenged mice induces eotaxin release from functionally polarized macrophages. **J Immunol**, v.185, n.4, p.2525-2535, 2010.

NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSAKA, M.; KUSAKA, H.; KUMAGAI, S.. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, p. 668-674, 2003.

NEGRETE-GARCÍA, M.C.; VELAZQUEZ, J.R.; POPOCA-COYOTL, A.; MONTES-VIZUET, A.R.; JUÁREZ-CARVAJAL, E.; TERAN, L.M. Chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1 is associated with leukocyte recruitment in asthma. **Chest**, v.138, n.1, p.100-106, 2010.

OPENSHAW, P.J. Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model. **Am J Respir Crit Care Med**, v.152, n.4 Pt 2, p.S59-S62, 1995.

PAREDI, P.; BARNES, P.J. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. **Thorax**, v.64, n.5, p.444-450, 2009.

PAVORD, I.D.; MARTIN, N. Will exhaled nitric oxide monitoring become routine in managing asthma? **Expert Rev Respir Med**, v.3, n.2, p.107-111, 2009.

PEDZIK A, P.; ARADOWSKI, M.; RYSZ J. Oxidative stress in nephrology. **Pol Merkur Lekarski**, v.28, n.163, p.56-60, 2010.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and

tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v.17, n.1, p.723-741, 1993.

ROESSNER, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; SCHNEIDER-STOCK, R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathol Res Pract**, v.204, n.7, p.511-524, 2008.

RYTER, S.W.; KIM, H.P.; HOETZEL, A.; PARK, J.W.; NAKAHIRA, K.; WANG, X.; CHOI, A.M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v.9, n.1, p.49-89, 2007.

SAAD, S.Y.; ARAFAH, M.M.; NAJJAR, T.A. Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. **Cancer Chemother Pharmacology**, v.59, n.4, p.455-460, 2007.

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

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur J Pharmacol**, v.331, n.1, p.43-52, 1997.

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

SCHETT, G. Joint remodelling in inflammatory disease. **Ann Rheum Dis**, v.66, n.3, p.42-44, 2007.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v.8, p.93-151, 2006.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: **TEXTBOOK OF IMMUNOPHARMACOLOGY**, New York: 1989, p.253-261.

SIDDIQUI, S.; HOLLINS, F.; SAHA, S.; BRIGHTLING, C.E. Inflammatory cell microlocalisation and airway dysfunction: cause and effect? **Eur Respir J**, v.30, n.6, p.1043-1056, 2007.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **J Pathol Bact**, v.72, n.1, p.367-380, 1956.

SPICUZZA, L.; DI MARIA, G.; POLOSA, R.. Adenosine in the airways: implications and applications. **Eur J Pharmacol**, v.533, p.77-86, 2006.

STROBER, W.; ZHANG, F.; KITANI, A.; FUSS, I.; FICHTNER-FEIGL, S. Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn's disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v.26, n.4, p.310-317, 2010.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A.E. Mechanism of disease: angiogenesis in inflammatory diseases. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v.3, n.1, p.635-643, 2007.

TAICHMAN, N.S.; YOUNG, S.; CRUCHLEY, A.T.; TAYLOR, P.; PALEOLOG, E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. **J Leukoc Biol**, v.62, n.3, p.397-400, 1997.

TAM, M.; SNIPES, G.J.; STEVENSON, M.M. Characterization of chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible inbred mouse strains. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.20, n.4, p.710-719, 1999.

THOMAS, S.R.; WITTING, P.K.; DRUMMOND G.R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v.10, n.10, p.1713-1765, 2008.

TINCANI, A.; ANDREOLI, L.; BAZZANI, C.; BOSISO, D.; SOZZANI, S. Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v.7, n.1, p.1-7, 2007.

VAJDOVICH, P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.38, n.1, p.31-123, 2008.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.693-733, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VAN DEN BRANDEN, C.; CEYSSENS, B.; PAUWELS, M.; VAN WICHELEN, G.; HEIRMAN, I.; JIE, N.; VERBEELEN, D. Effect of mycophenolate mofetil on glomerulosclerosis and renal oxidative stress in rats. **Nephron Exp Nephrol**, v.95, n.3, p.e93-99, 2003.

VAN HORSSSEN, J., DREXHAGE, J.A., FLOR, T., GERRITSEN, W., VAN DER VALK, P., DE VRIES, H.E. Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. **Free Radic Biol Med**, v.49, n.8, p.1283-1289, 2010.

VASS, G.; HORVÁTH, I. Adenosine and adenosine receptors in the pathomechanism and treatment of respiratory diseases. **Curr Med Chem**, v.15, n.9, p.917-922, 2008.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed. Proc**, v.41, n.1, p.2588-2595, 1976.

VON KNETHEN, A.; SOLLER, M.; BRÜNE, B. Peroxisome proliferator-activated receptor ($\text{PPAR}\gamma$) and sepsis **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.55, n.1, p.19-25, 2007.

VON VIETINGHOFF, S.; OUYANG, H.; LEY, K. Mycophenolic acid suppresses granulopoiesis by inhibition of interleukin-17 production. **Kidney Int**, v.78, n.1 p.79-88, 2010.

WALTERS, E.H.; SOLTANI, A.; REID, D.W.; WARD, C. Vascular remodelling in asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v.8, n.1 p.39-43, 2008.

WEDES, S.H.; KHATRI, S.B.; ZHANG, R.; WU, W.; COMHAIR, S.A.; WENZEL, S.; TEAGUE, W.G.; ISRAEL, E.; ERZURUM, S.C.; HAZEN, S.L. Noninvasive markers of airway inflammation in asthma. **Clin Transl Sci**, v.2, n.2, p.112-117, 2009.

WEIMER, R.; MYTILINEOS, J.; FEUSTEL, A.; PREISS, A.; DANIEL, V.; GRIMM, H.; WIESEL, M.; OPELZ, G. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes: effects on monokine secretion and antigen presentation in long-term renal transplant recipients. **Transplantation**, v.75, n.12, p.2090-2099, 2003.

WU, G.J.; TSAI, G.J. Chitooligosaccharides in combination with interferon-gamma increase nitric oxide production via nuclear factor-

kappaB activation in murine RAW264.7 macrophages. **Food Chem Toxicol**, v.45, n.2, p.250-258, 2007.

YAMAMOTO, S.; DUNN, C.J.; CAPASSO, F.; DEPORTER, D.A.; WILLOUGHBY, D.A.; HUSKISSON, E.C. Quantitative studies on cell-mediated immunity in the pleural cavity of guinea pigs. **J Pathol**, v.117, n.2, p.65-73, 1975.

YAN, F.; MU, Y.; YAN, G.; LIU, J.; SHEN, J.; LUO G. Antioxidant enzyme mimics with synergism. **Mini Rev Med Chem**, v.10, n.4, p.342-356, 2010.

YANG, Y.F.; TAN, D.M.; XIE, Y.T.; ZHAO, W.; HOU, Z.H.; ZHONG, Y.D. Mycophenolate mofetil prevents lethal acute liver failure in mice induced by bacille Calmette-Guérin and lipopolysaccharide. **J Gastroenterol Hepatol**, v.23, n.4, p.611-618, 2008.

YANG, C.M.; LUO, S.F.; HSIEH, H.L.; CHI, P.L.; LIN, C.C.; WU, C.C.; HSIAO, L.D. Interleukin-1beta induces ICAM-1 expression enhancing leukocyte adhesion in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: involvement of ERK, JNK, AP-1, and NF-kappaB. **J Cell Physiol**, v.224 n.2, p.516-526, 2010.

YAP, D.Y.; LAI, K.N. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. **J Biomed Biotechnol**, v.1, n.20, p.1-10, 2010.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflamm Res**, v.55, n.9, p.359-363, 2006.

XU, S.; CAO, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. **Cell Mol Immunol**, v.7, n.3, p.164-174, 2010.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil adhesion and activation under flow. **Microcirculation**, v.16, n.1, p.31-42, 2009.

ZHOU, Y.; SCHNEIDER, D.J.; BLACKBURN, M.R. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. **Pharmacol Ther**, v.123, n.1, p.105-116, 2009.

ZHU, L.J.; LANDOLT-MARTICORENA, C.; LI, T.; YANG, X.; YU, X.Q.; GLADMAN, D.D.; UROWITZ, M.B.; FORTIN, P.R.; WITHER, J.E. Altered Expression of TNF- α Signaling Pathway Proteins in Systemic Lupus Erythematosus. **J Rheumatol**, v.37, n.8, p.1658-1666, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1

**Protocolo de aprovação no comitê de ética na experimentação
animal (CEEA/FURB 022/2006)**



DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o protocolo de pesquisa intitulado **“Análise do efeito do Micofenolato Mofetil sobre a resposta inflamatória induzida pela Carregenina em Camundongos”**, tendo como pesquisador responsável o Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco. Projeto protocolado no Comitê de Ética na Experimentação com Animais sob nº 022/06 e aprovado na reunião do dia 16/08/06.

Blumenau, 23 de agosto de 2006.

Prof.ª Dra. Vera Iten Teixeira
 Coordenadora do Comitê de Ética

CONFERE COM O ORIGINAL

ASS.: _____
 FURB - Comitê de Ética na
 Experimentação com Animais / CEEA

ANEXO 2

**Protocolo de aprovação no comitê de ética na experimentação
animal (CEEAFURB 022/2007)**



DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o **Subprojeto/PIBIC**, intitulado, “Análise da Atividade da Mieloperoxidase (MPO), Adenosina-desaminase (ADA) e dos níveis de óxido Nítrico (NO), em camundongos tratados com Micofenolato Mofetil (MMF), no modelo da pleuresia induzida pela carragenina”. **Vinculado ao projeto**, Análise do efeito do Micofenolato Mofetil (MMF) sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos, tendo como pesquisador principal, Prof. Eduardo M. Dalmarco. Projeto protocolado neste Comitê sob nº. 022/07 e aprovado na reunião do dia 16/05/07.

Blumenau, 17 de maio de 2007.

Prof. Dra. Vera Iten Teixeira

Coordenadora do Comitê de Ética na Experimentação com Animais

CONFERE COM O ORIGINAL

ASS: _____

FURB - Comitê de Ética na
Experimentação com Animais - CEEA

Resumos apresentados em anais de congressos

FRÖDE, Tânia Silvia ; **DALMARCO, E. M.** ; Budni, P. ; Parisotto, E. ; Wilhelm Filho, D. Down-regulation of antioxidant status and Lipid peroxidation in the inflamed pleural cavity of mice treated with Mycophenolate Mofetil. In: 2009 Annual Meeting - AACC, 2009, Chicago. American Association for Clinical Chemistry, 2009. v. 55. p. A2-A2.

DALMARCO, E. M. ; Astolfi, G. ; FRÖDE, Tânia Silvia. Modulatory effects of mycophenolate mofetil upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. In: Reunião da federação de sociedades de biologia experimental - Fesbe, 2009, Águas de Lindóia. XXIV Reunião Anual - Fesbe, 2009.

ASTOLFI, G. ; **DALMARCO, E. M.** ; FRÖDE, Tânia Silvia . Mycophenolate mofetil inhibits the inflammation caused by carrageenan in the mouse model air-pouch. In: XXIV Reunião Anual -FeSBE, 2009, Águas de Lindóia. XXIV Reunião Anual -FeSBE, 2009.

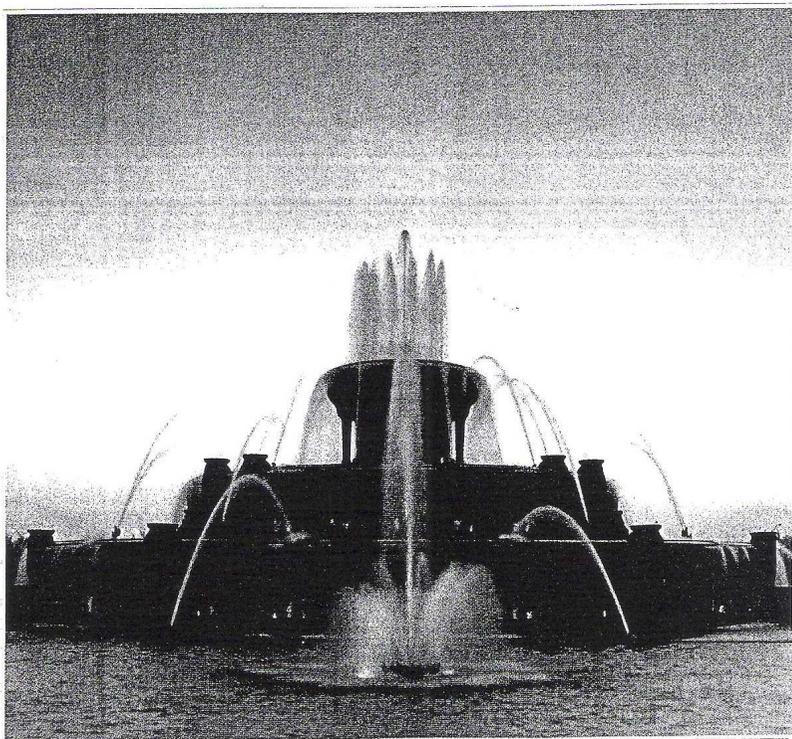
FRÖDE, Tânia Silvia ; **DALMARCO, E. M.** ; MEDEIROS, Yara dos Santos . Antiinflammatory efficacy of mycophenolate mofetil in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. In: Annual Meeting of Clinical Chemistry, 2008, Washington. Clinical Chemistry, 2008. v. 54. p. A70-A71.

Clinical Chemistry

www.clinchem.org

Volume 55, Number S6, Pages A1-A286

JUNE 2009



Tuesday, July 21, 10:00 am - 12:30 pm

Tuesday AM, July 21

Poster Session: 10:00 am - 12:30 pm
Animal Clinical Chemistry

A-1

Clinical Pathology Reference Ranges for Pregnant Rats: A Comparison to Non-pregnant Rats

K. Williams, Bristol-Myers Squibb, New Brunswick, NJ

The objective of this study was to establish historical in house clinical pathology reference ranges for pregnant, non-fasted Sprague-Dawley (SD) rats. A study was conducted in the Drug Safety Evaluation, Clinical Pathology Department, to provide data from samples collected on Gestation Day (GD)14 from 11 week old pregnant, non-fasted SD rats. Samples for routine clinical chemistry parameters were analyzed on the Roche Hitachi 917[®] and for routine hematology parameters on the Siemens Advia 120[®]. Mean values were compared to historical in house means from non-pregnant, fasted SD rats. Based on the literature^{1,2,3,4,5}, the following changes were expected in clinical chemistry and hematology parameters during pregnancy. Lower values in clinical chemistry were expected for Aspartate Aminotransferase, and Alkaline Phosphatase activities, Glucose, Cholesterol, Total Protein, Albumin, Globulin, Albumin/Globulin ratio, Creatinine, Total Bilirubin, Phosphorus, Calcium, Blood Urea Nitrogen, Sodium, Chloride and higher values were expected for Alanine Aminotransferase, Triglyceride and Potassium. We saw changes that correlated with this except for Aspartate Aminotransferase and Alkaline Phosphatase activities, Total Protein, Albumin, Globulin, Calcium and Blood Urea Nitrogen concentrations. We could explain the unanticipated changes in Aspartate Aminotransferase and Alkaline Phosphatase activities based on a comparison between the fasting and non-fasting state⁶. Concentrations of Total Protein, Albumin and Globulin have not been found to be consistent in the pregnant rat⁷ and could provide a possible explanation. Differences in Calcium were likely associated with differences found in Albumin. We could not explain the unanticipated increase in Blood Urea Nitrogen, nor the large increase observed with Alanine Aminotransferase (for which we observed more variability with pregnancy), but did not consider these differences to be biologically relevant. In hematology, lower values were expected for Hemoglobin, Hematocrit, and Red Blood Cell Count and higher values were expected for White Blood Cell Count, Platelet and Absolute Reticulocytes. The results we obtained corroborated these expectations. A p-value was calculated to determine the amount of probable difference in the populations between pregnant, non-fasted rats and non-pregnant, fasted rats for each assay. P-values generated from the data revealed that pregnancy significantly affected most of the assays, however, most of the clinical chemistry and hematology changes were anticipated and the unexpected results were not considered to be biologically significant. Based on clinical chemistry and hematology differences between pregnant, non-fasted rats vs. non-pregnant, fasted rats from this study, it was determined it was necessary to publish reference range limits for pregnant, non-fasted rats.

A-2

Modulation of inflammatory reaction by *Rosmarinus officinalis* L. in a murine model of pleurisy induced by carrageenan.

T. S. Frode, J. P. Benincá, J. B. Dalmarco, M. P. Pizzolatti. University Federal of Santa Catarina, Brasil, Brazil

Background: *Rosmarinus officinalis* L. known as rosemary is a native plant in the Mediterranean area and it has been cultivated in several Brazilian States. This plant is used in the folk medicine to treat inflammatory diseases such as bronchial asthma.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of crude extract (CE) of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions (op: leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) activity and nitric oxide (NO) level) using a murine model of pleurisy induced by carrageenan. **Methods:** Swiss mice were used in the in vivo experiments. Initially, different groups of animals were pretreated with CE (25-100 mg/kg.i.p.), hexanic fraction (HEX:10-50mg/kg), ethyl acetate acetonate (AcOEt:5-50mg/kg) or stannolic fraction (ET:10-50 mg/kg) administered by intraperitoneal route (i.p.) 0.5h before carrageenan (Cg)1%, administered by intraperitoneal route. The inflammatory parameters were analyzed after 4h. To evaluate the MPO activity and NO level different groups of animals were pretreated (0.5h) with CE (50 mg/kg.i.p.), HEX (10 mg/kg.i.p.), AcOEt (10 mg/kg.i.p.) or ET (50 mg/kg.i.p.). The inflammation was also analyzed after 4h. The animals were previously

Animal Clinical Chemistry

challenged (1h) with a Evans blue dye (25 mg/Kg.i.v.), except those experiments that it was analyzed MPO activity and nitric oxide levels, in order to evaluate the exudation. Dexamethasone was used as a reference drug. Statistical differences between groups were determined by Student's t test and analysis of variance (ANOVA) complemented with Dunnett's test. Values of P<0.05 were considered significant. **Results:** Crude extract of *Rosmarinus officinalis* and its derived fractions significantly decreased leukocytes (% of inhibition: CE:50 mg/kg: 36.31±5.34, 100 mg/kg: 35.68±3.87, HEX:10 mg/kg: 34.37±4.77, 25mg/Kg: 41.25±8.31, 50 mg/kg: 46.53±5.56, AcOEt: 10mg/kg: 35.21±4.96, 25 mg/Kg: 40.98±3.36, 50 mg/kg: 58.86±5.29, ET:50mg/kg: 61.04±5.52), neutrophils (% of inhibition: CE:50 mg/kg: 40.45±7.23, 100 mg/kg: 42.56±6.84, HEX:10 mg/kg: 36.24±4.13, 25 mg/kg: 42.15±7.62, 50 mg/kg: 52.72±4.83, AcOEt: 10mg/kg: 40.88±4.34, 25 mg/kg: 44.51±4.27, 50 mg/kg: 64.64±8.03, ET:50mg/kg: 64.34±5.18) and/or exudation (% of inhibition: CE:50mg/kg: 14.98±4.47, 100 mg/kg: 15.57±5.38, HEX:25 mg/kg: 25.84±7.17, 50mg/kg: 19.63±4.90, AcOEt: 10mg/kg: 29.55±8.94, 25 mg/kg: 34.78±3.69) (P<0.05). CE (50mg/kg), HEX (10mg/kg), AcOEt (10mg/kg) and ET (50mg/kg) also inhibited MPO activity (CE: 52.09±12.49%, HEX: 58.40±4.55%, AcOEt: 38.70±8.20%, ET: 29.77±9.65%) and/or NO levels (CE: 34.01±6.88%, AcOEt: 46.93±7.78%, ET: 58.68±5.74%) (P<0.05). **Conclusion:** *Rosmarinus officinalis* showed important anti-inflammatory activity, by inhibiting leukocytes and exudation. This effect may be attributed to the inhibition of MPO and NO considered mediators related to the activation and chemotaxis of leukocytes.

A-3

Down-regulation of antioxidant status and Lipid peroxidation in the inflamed pleural cavity of mice treated with Mycophenolate Mofetil.

T. S. Frode, E. M. Dalmarco, P. Budni, E. B. Parisotto, D. Wilhelm-Filho. University Federal of Santa Catarina, Brasil, Brazil

Background: Mycophenolate mofetil (MMF) is a product of mycophenolic acid (MPA), an inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase enzyme. MMF is an important immunosuppressive drug used in the treatment of solid organ and more recently in the inflammatory diseases such as autoimmune hepatitis and systemic vasculitis. Further, oxidative stress inducing by reactive oxygen species (ROS) is believe to be the source of oxidative damage, as well as a primary factor in the etiology of the inflammatory diseases.

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of MMF administered by oral route (p.o.) upon: Catalase (CAT), Superoxide-dismutase (SOD), Glutathione-Peroxidase (GPx) and Glutathione-S transferase (GST) activities, as well as on the lipidic peroxidation (TBARS) in the inflammatory response induced by carrageenan in the mice pleural cavity.

Material and Methods: Non-fasted adult Swiss mice, aged 1 month, were used throughout the experiments. Pleurisy was induced by a single intraperitoneal injection of 0.1 mL of carrageenan (Cg, 1%) into the pleural space according to the methodology described by Saleh et al., 1996. The inflammatory parameters were analysed 4h and 48h after carrageenan-induced pleurisy. Previous study in our laboratory demonstrated that MMF at dose of 100 mg/kg administered 0.5h before carrageenan administration was effective in inhibiting either leukocytes and exudation in both phases (4h and 48h) of carrageenan-induced inflammation. These dose and time of pretreatment were chose to analyse the effect of MMF upon: CAT, SOD, GPx, GST and TBARS activities in the pleural space and/or blood. The studied enzymes were analysed using the methodologies described by Beers and Seizer (1952) for CAT, Misra and Fridovich (1972) for SOD, Flohé & Gunzler (1984) for GPx, Habig et al. (1976) for GST and Okkava (1979) for TBARS. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) complemented with Dunnett's and/or Student's t tests. P<0.05 was considered as indicative of significance.

Results: In the early phase (4h) of the inflammation response caused by carrageenan MMF (100mg/kg) significantly decreased all the studied inflammatory enzymes (% of inhibition: CAT: 13.2±1.9%, SOD: 16.0±3.4%, GPx: 32.1±6.8%, and GST: 53.7±3.1%) (P<0.05). On the second phase (48h) MMF at the same dose also inhibited these studied parameters (% of inhibition: CAT: 18.4±5.5%, SOD: 18.5±4.8%, GPx: 35.1±0.3%, and GST: 30.2±4.6%) (P<0.05). MMF (100mg/kg) caused also a marked reduction in TBARS activity in both phases (4h and 48h) (% of inhibition 4h: 22.6±5.6%, 48h: 22.8±3.0%) (P<0.05).

Conclusion: Mycophenolate mofetil exerted an important anti-inflammatory effect by inhibiting oxidative stress in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. This effect may be due to, at least in part, its capacity to down-regulate the generation of ROS.

12



FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia - São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 28.022

**MODULATORY EFFECT OF MYCOPHENOLATE MOFETIL UPON
 INFLAMMATORY PARAMETERS INDUCED BY CARRAGEENAN IN
 THE MOUSE MODEL OF PLEURISY.**

Dalmarco, E. M. ¹, Astolfi, G. ³, Fróde, T. S. ³

¹ Ciências Farmacêuticas, FURB ³ Análises Clínicas, UFSC foi
 apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
 Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
 de 19 a 22 de agosto de 2009.



Comissão Organizadora





FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 28.050

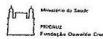
MYCOPHENOLATE MOFETIL INHIBITS THE INFLAMMATION
 CAUSED BY CARRAGEENAN IN THE MOUSE AIR-POUCH MODEL.

Astolfi, G. ¹, Dalmarco, Em. ², Fröde, Ts. ¹

¹ Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, UFSC ² Universidade
 Regional de Blumenau, FURB foi apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
 Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
 de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora

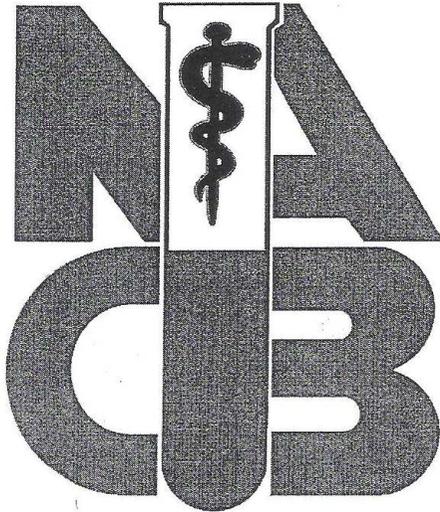


ANEXO 4

Prêmio internacional de melhor resumo

2009 Annual Awards Luncheon and Membership Meeting - National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), American Association of Clinical Chemistry (AACC).

Poster Apresentado: ***Down-regulation of antioxidant status and Lipid peroxidation in the inflamed pleural cavity of mice treated with Mycophenolate Mofetil.***



**Annual Awards Luncheon
and Membership Meeting**

July 22, 2009

12:30—2:15 p.m.

**Fairmont Hotel
Chicago, IL**

NACB 2009 Distinguished Abstracts

- A-3 Tania S. Frode
Down-regulation of Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in the Inflamed Pleural Cavity of Mice Treated with Mycophenolate Mofetil
- A-31 Raffick A.R. Bowen
Improvements in Turnaround Time (TAT) after Computerized Autoverification in a Rapid Response Clinical Chemistry Laboratory
- B-77 Ioannis Papassotiriou
Soluble Endoglin and Its Interaction with Adhesion Molecules in Patients with Thalassemia Intermedia
- B-87 Debra A. Hoppensteadt
Activation of Prekallikrein by Contaminated Heparins, Isolated Contaminant and Related Hypersulfated Chondroitin Sulfate Preparations: Pharmacologic Implications
- B-94 Jamila Hirbawi
The Function of Acidic Amino Acid Region 659-663 of Factor Va on Prothrombinase during Prothrombin Activation
- B-114 Andrew N. Hoofnagle
Clinical Lipoproteomics Unveils Clusterin as a Novel Biomarker of Insulin Resistance
- B-129 Stacy J. Hartman
Elevated C-Reactive Protein is Associated with Elevated LDL Particle Concentration in Patients with Normal Calculated LDL Cholesterol

ANEXO 5

Artigo Publicado



Antioxidant effects of mycophenolate mofetil in a murine pleurisy model

Eduardo Monguilhott Dalmarco^a, Patrícia Budni^b, Eduardo Benedetti Parisotto^b, Danilo Wilhelm Filho^b, Tânia Sílvia Fróde^{c,*}

^a Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, University Regional of Blumenau, Itoupava Seca, Blumenau, SC, 89000-030, Brazil

^b Department of Ecology and Zoology, Biology Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-970, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2009

Received in revised form 10 September 2009

Accepted 11 September 2009

Keywords:

Mycophenolate mofetil

Reactive species

Inflammation

Pleurisy

Lipid peroxidation

Anti-inflammatory effect

ABSTRACT

Generation of oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) is believed to be a primary factor in the etiology of various inflammatory diseases. Although, the process of generation of oxygen species is a physiological event, in the inflammatory process this event is increased and produces large amounts of reactive species that leads to lipid peroxidation and to cell death. Mycophenolate mofetil (MMF) is a drug effective in protecting against chronic allograft failure and recently was introduced as an alternative for the treatment of various inflammatory diseases such as glomerulopathies, systemic lupus erythematosus and systemic vasculitis. Based on studies of the anti-inflammatory effect of MMF the aim of this study was to evaluate the effects of MMF on the inhibition of leukocytes and exudation, as well as myeloperoxidase and some antioxidant enzyme activities using carrageenan-induced pleurisy in mice. Our results showed that MMF significantly decreased leukocyte influx ($P < 0.01$), exudation ($P < 0.01$), superoxide dismutase ($P < 0.05$), catalase ($P < 0.05$), glutathione peroxidase ($P < 0.01$), glutathione *S*-transferase ($P < 0.01$) activities, levels of lipid peroxidation ($P < 0.05$), as well as myeloperoxidase activity ($P < 0.05$) on both phases (4 h and 48 h) of the inflammatory response induced by carrageenan into the mice pleural cavity.

In conclusion, the anti-inflammatory effect of MMF may be, at least in part, via inhibition of ROS and/or RNS overgeneration, and consequently, attenuating the related oxidative stress.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals is believed to be a primary factor in the etiology of various disease [1]. Inflammatory reactions, particularly chronic ones, can be significant sources of oxidative damage [2]. The activated cells such as leukocytes, macrophages and neutrophils release several ROS, which can react with several important biomolecules leading to damage in proteins, lipids and DNA of nearby cells [3].

The role of redox balance and ROS in terms of both cell survival and proliferation, as well as in cell death, recently gained the attention of physicians involved in the study of several autoimmune diseases.

Furthermore, there are many evidence that inflammatory diseases have an important involvement in ROS and RNS generation, such as superoxide anion, peroxyinitrite, nitric oxide among others, which lead to lipid peroxidation or oxidative degeneration of lipids. Also, lipid peroxidation is caused by a free radical chain reaction mainly involving membrane polyunsaturated fatty acids. If not quenched, this reaction can permanently damage cell membranes leading to cell death [3]. There are evidence that lipid peroxidation plays a central role in metabolic disorders such as metabolic syndrome, renal failure, hypertension, as well as in inflammatory process. A continued rise of oxidative stress due to changes in reduction–oxidation (redox) homeostasis seems to be a hallmark of the processes that regulate gene transcription in health and disease. Moreover, RNS and ROS serve as signaling messengers for the evolution and maintenance of the inflammatory process [4].

One of the several drugs that demonstrated to be effective in the treatment of autoimmune diseases is the mycophenolate mofetil (MMF) [5,6]. This drug is a prodrug of mycophenolic acid (MPA), an inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase. Mycophenolate mofetil is also reported to be effective in protecting against chronic allograft failure [7]. The immunosuppressive activity of MMF is based on its capacity to reversibly inhibit the inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in the purine synthesis pathway promoting a selective inhibition

Abbreviations: CAT, catalase; CDNB, (1-chloro-2,4-dinitrobenzene); COBEA, Brazilian College of Animal Experimentation; Dex, Dexamethasone; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSSH, oxidized glutathione; GST, glutathione *S*-transferase; HUVECs, human endothelial cells from umbilical vein; Indo, indomethacin; MMF, mycophenolate mofetil; MPO, myeloperoxidase; PBS, phosphate buffered saline; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

* Corresponding author. Fax: +55 48 32 44 09 36.

E-mail address: salehb@ccs.ufsc.br (T.S. Fróde).

of replication of T and B lymphocytes [8]. Recently, MMF has been introduced as an alternative drug for the treatment of various inflammatory diseases that are refractory to the conventional treatment such as glomerulopathies [9], autoimmune diseases especially systemic lupus erythematosus [5] and systemic vasculitis [10].

2. Objective

Preliminary studies in our laboratory demonstrated that oral administration of MMF has an effective anti-inflammatory property in a murine pleurisy model induced by carrageenan. In this study, we wondered if its anti-inflammatory property could be attributed, at least in part to the inhibition of reactive species of nitrogen (RNS) and/or oxygen (ROS). The aim of this study was to evaluate the effect of MMF on leukocytes and exudation levels, as well as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), and myeloperoxidase (MPO) activities and lipoperoxidation (TBARS) levels, using the mouse pleurisy model induced by carrageenan.

3. Materials and methods

3.1. Animals

Swiss mice weighing 18–25 g, were housed under standardized conditions (room at constant temperature of 22 ± 2 °C, with alternating 12 h periods of light and darkness, humidity 50–60%), and were fed on a standard mouse diet with water *ad libitum* before use. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of Regional University of Blumenau (Protocol number 026/2006–16/08/2006) and experiments were performed in accordance with the norms of Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Efforts were made to minimize the number of animals in all experiments.

3.2. Pleurisy induction and analysis

Pleurisy was induced by a single intrapleural injection (i.p.) of 0.1 mL of sterile saline plus carrageenan (1%) [11]. After killing the animals with an overdose of pentobarbital (60 mg/kg, i.p.), the thorax was opened and the pleural cavity was washed with 1.0 mL of sterile PBS (pH 7.6), composition: NaCl (130 mmol), Na_2HPO_4 (5 mmol), KH_2PO_4 (1 mmol) and distilled water (1000 mL) containing heparin (20 IU/mL). Several samples of the fluid leakage were collected to further determine the total and differential leukocyte, exudation, myeloperoxidase activities (MPO) that were immediately determined in the day of the experiments. To evaluate catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) activities, animals were anesthetized with intraperitoneal injection (i.p.) of pentobarbital (25 mg/kg), and whole blood samples were collected by cardiac puncture using vacutainer® system containing heparin. In the same day of the experiments the enzyme activities were immediately performed. For determination of thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels, the fluid pleural cavity was frozen at nitrogen liquid (-196 °C) until the day of the experiments.

Analyses of all enzymes and thiobarbituric acid-reactive substance were measured in triplicate.

Initially, for the dose determination to be used in the experiments, a dose–response curve with different doses of mycophenolate mofetil (MMF) (1, 10, 50, 100 and 200 mg/kg) administered by oral route (p.o) was performed. A group of animals ($N=5$ animals for each dose) was treated 0.5 h before pleurisy induction with different doses of MMF and the inflammatory parameters (leukocytes and exudation) were analysed 4 h after carrageenan injection. Based on this protocol results, one dose of MMF was chosen to analyse the time course profile (1 h, 2 h, 4 h and 8 h of pre-treatment, $N=5$ animals for each period of time) of this

drug, as well as the other inflammatory parameters in this first (4 h) inflammatory reaction phase.

For the analysis of MMF in the late (48 h) carrageenan phase induced inflammatory response, different groups of animals were also treated with different doses of MMF (1, 10, 50, 100 and 200 mg/kg) administered by oral route (p.o.) 0.5 h before carrageenan injection ($N=5$ animals for each dose). The inflammatory parameters: leukocytes and exudation levels were evaluated 48 h after pleurisy induction. According to this data, one dose of MMF was chosen to be used to evaluate the time course profile of this drug (1 h, 2 h, 4 h and 8 h of pre-treatment, $N=5$ animals for each period of time), as well as the other inflammatory parameters in this late (48 h) inflammatory reaction phase. In both (4 h and 48 h) phases, Dexamethasone (Dex) and Indomethacin (Indo) were used as reference drugs with potent anti-inflammatory property. In these protocols different groups of animals were pre-treated (0.5 h) with either Dexamethasone (Dex: 0.5 mg/kg, $N=5$) or Indomethacin (Indo: 5 mg/kg, $N=5$) administered by intraperitoneal route. The same inflammatory parameters were evaluated 4 h and 48 h after.

In parallel a positive control group (animals treated only with carrageenan ($N=5$)) and a negative control group (animals treated only with sterile phosphate buffer saline PBS (pH 7.6) ($N=5$)) were performed. The same inflammatory parameters (leukocytes and exudation levels) were analysed 4 h and 48 h after pleurisy induction.

3.3. Quantification of cell migration and exudation levels

After killing the animals (4 h and 48 h after pleurisy), samples of the fluid pleural cavity were collected to determine the total and differential leukocyte contents, and exudation. Total leukocytes were determined in a Neubauer chamber diluting the exudates in Türk solution (1:20), and cyto spin preparations of exudates were stained with May–Grünwald–Giemsa for the differential count, which was performed under an oil immersion objective. The exudation degree was determined by the measurement of the amount of Evans blue dye extravasation in the exudate as previously described [11]. Thus, in each experimental group, the animals were previously challenged (1 h) before carrageenan injection with a solution of Evans blue dye (25 mg/kg) administered by intravenous route (i.v.) in order to evaluate the exudation degree into the pleural cavity. On the day of the experiments, the amount of dye was estimated by colourimetry using an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) at 600 nm, by interpolation from a standard curve of Evans blue dye in the range of 0.01–50.0 g/mL.

3.4. Quantification of myeloperoxidase activity

Myeloperoxidase activity in pleural leakage was measured according to the method developed by Rao et al. [12]. Briefly, standard samples with different concentrations of myeloperoxidase (from human neutrophils, Sigma: M6908) were prepared in order to obtain a standard curve in the range of 0.07–140 mU mL⁻¹. Pleural aliquots (40 µL) and standards were transferred to cuvettes and the reaction was initiated with the addition of 360 µL of assay buffer (0.167 mg/mL of o-dianisidine 2HCl and 0.0005% H_2O_2). The reaction was stopped with sodium azide 1%. Afterwards, the samples were centrifuged at 50 xg for 5 min, the supernatants were separated, and the change rates in absorbancy (450 nm) were determined on an Elisa plate reader [11]. Myeloperoxidase activity was estimated by interpolation from the standard curve described above. Results were expressed as mU mL⁻¹.

3.5. Quantification of antioxidants enzymes

3.5.1. Superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase (SOD) activity was analysed in the whole blood in accordance to the method described by Misra and

Frđovich [13] and modified by Boveris et al. [14]. This reaction is based on the epinephrine oxidation (pH 2.0 to pH 10.0) produced by superoxide anion from xanthine/xanthine oxidase system that generates a pink chromophore named formazan. In this protocol, the epinephrine–adrenochrome transition was inhibited by superoxide dismutase present in the blood. The absorbance was observed every 30 s for 3 min at 480 nm in an UV/Visible spectrophotometer (GBC-916, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia). The unit enzyme activity was expressed as 50% of auto-oxidation inhibition of epinephrine–adrenochrome.

3.5.2. Catalase activity

The catalase (CAT) activity was determined in the whole blood in accordance to the methodology described by Aebi [15]. The reaction is based on the breakdown of hydrogen peroxide (dissolved on phosphate buffer: mmol: NaCl 137, KCl 2.7 and phosphate buffer salts 10) in the presence of enzyme (CAT) in the blood resulting in the decrease of peroxide solution. The CAT activity was measured as the change in optical density every 30 s for 3 min at 240 nm in an UV/Visible spectrophotometer (GBC-916, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia). The enzyme activity was expressed as $\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

3.5.3. Glutathione peroxidase activity

The glutathione peroxidase (Gpx) activity was analysed in the whole blood using the method described by Flohé and Günzler [16]. Briefly, this method is based on the *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) dismutation via oxidation of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG). Further, this oxidation is catalyzed by Gpx resulting in the decrease of absorbance that was evaluated at 340 nm in an UV/Visible spectrophotometer (GBC-916, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia). In this protocol, to avoid the over evaluation of the enzyme activity due to the hemoglobin oxidation present in the blood, 50 mM of KCN was added. The unit enzyme activity was expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

3.5.4. Glutathione S-transferase activity

The glutathione S-transferase (GST) activity was also studied in the whole blood using the methodology described by Habig et al. [17]. In this protocol, the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (substrate for GST) was used. In this reaction, GST with glutathione (GSH) promote the CDNB–GSH conjugation (formation of DNP–glutathione conjugate [DNP–SG] via nucleophilic displacement of Cl^- with the GSH–thiol). This reaction was monitored spectrophotometrically for 60 s at 340 nm in an UV/Visible spectrophotometer (GBC-916, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia). The enzyme unit activity was expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

3.6. Quantification of liperoxidation levels

The endogenous lipid oxidation was evaluated in the pleural fluid leakage by determination of thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) according to the method described by Bird and Draper [18]. In this protocol, products of lipid peroxidation react with thiobarbituric acid producing a pink Schiff base that was measured spectrophotometrically at 535 nm, in an UV/Visible spectrophotometer (GBC-916, GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia). The concentrations of TBARS were expressed as mmol of TBARS mL^{-1} .

In these protocols mentioned above a positive control group (animals treated only with carrageenan ($N=5$)) and a negative control group (animals treated only with sterile phosphate buffer saline PBS (pH 7.6) ($N=5$)) were performed. The same inflammatory parameters (MPO activity, and SOD, CAT, Gpx, GST, and TBARS levels) were analysed 4 h and 48 h after pleurisy induction.

3.7. Drugs and reagents

The following drugs were purchased as indicated: mycophenolate mofetil (Cell Cept, Roche, Milano, Italy); Dexamethasone (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brazil), Carrageenan- λ (degree IV), cytochrome-c, CDNB (1-chloro-2, 4-dinitrobenzene), DTPA (diethylenetriaminopentaacetic acid), Evans blue dye, ethanol, hydroxide sodium, glutathione reductase, human polymorphonuclear leukocyte myeloperoxidase, Indomethacin, L-glutathione reduced, NADPH (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced), o-dianisidine 2HCl (3,3'-dimethoxybenzidine), sodium azide, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), trichloroacetic acid, Tris–HCl buffer, 2-thiobarbituric acid, xanthine, xanthine oxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), heparin (Liquemine® Roche, São Paulo, SP, Brazil), hydrogen peroxide (H_2O_2 30%) (Biotech, São Paulo, SP, Brazil), NaCl (0.9%), zinc-sulfate-7-hydrated, chloride acid and May-Grünwald–Giemsa dye from different commercial sources. Other chemicals and solvents used were of analytical grade and obtained from different commercial sources.

3.8. Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Statistical differences between groups were determined by variance analysis (ANOVA) via two-ways, complemented with Dunnett's and/or Student's *t*-tests, when necessary. $P < 0.05$ was considered as indicative of significance.

4. Results

4.1. Leukocytes and oxidation levels

In the early (4 h) inflammatory reaction phase induced by carrageenan, MMF at the doses of 100 and 200 mg/kg significantly decreased leukocytes by $51.7 \pm 3.4\%$, and $52.6 \pm 11.1\%$, respectively ($P < 0.01$). At the same conditions, this drug also promoted a significant reduction in neutrophils by $60.9 \pm 3.3\%$, and $63.4 \pm 8.5\%$ ($P < 0.01$) and oxidation levels by $25.7 \pm 2.7\%$, and $24.7 \pm 2.5\%$, respectively ($P < 0.01$). In this phase the mononuclears did not vary ($P > 0.05$). Dex and Indo also inhibited leukocytes by $66.0 \pm 3.8\%$, and $45.5 \pm 5.3\%$, neutrophils by $78.3 \pm 4.5\%$, and $53.9 \pm 4.7\%$, and oxidation levels by $36.7 \pm 4.0\%$, and $43.3 \pm 3.1\%$, respectively ($P < 0.01$) (Table 1).

Regarding this second (48 h) inflammatory process phase, MMF (100 and 200 mg/kg) also significantly inhibited leukocytes by $59.8 \pm 5.8\%$, and $63.0 \pm 7.8\%$ ($P < 0.01$), mononuclears by $76.1 \pm 3.1\%$, and $75.7 \pm 5.6\%$ ($P < 0.01$) and oxidation levels by $51.6 \pm 11.7\%$, and $46.0 \pm 3.5\%$, respectively ($P < 0.01$). MMF did not alter neutrophils ($P > 0.05$) (Table 1). Dex and Indo also inhibited leukocytes by $61.0 \pm 2.4\%$, and $55.2 \pm 8.5\%$, neutrophils by $69.9 \pm 4.6\%$, and $57.0 \pm 8.2\%$, mononuclears by $56.3 \pm 3.1\%$, and $54.6 \pm 7.21\%$, and oxidation levels by $25.8 \pm 5.2\%$, and $29.1 \pm 7.0\%$, respectively ($P < 0.05$) (Table 1).

In both phases (4 h and 48 h) of this inflammatory reaction, MMF was only effective in causing an inhibitory effect upon leukocyte and oxidation levels when it was given 0.5 h before carrageenan injection (results not shown). Thus, the doses of 100 mg/kg administered 0.5 h before carrageenan induction was chosen to analyse the effect of this drug upon MPO, antioxidants enzymes activities (SOD, CAT, Gpx and GST), as well as, liperoxidation levels (TBARS).

4.2. Myeloperoxidase activity

Mycophenolate mofetil (100 mg/kg) was able to decrease MPO activity by $59.3 \pm 12.2\%$ at 4 h and $32.2 \pm 10.4\%$ at 48 h in the inflammatory response induced by carrageenan ($P < 0.05$) (Fig. 1A and B). Dex and Indo also inhibited this enzyme by $70.5 \pm 12\%$, and 72.3 ± 3.7 at 4 h and also $38.7 \pm 4.1\%$, and $24.6 \pm 4.3\%$ at 48 h, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1A and B).

4.3. Antioxidant enzyme activities

Mycophenolate mofetil (100 mg/kg) significantly decreased antioxidant enzymes (% of inhibition SOD: $16.0 \pm 3.4\%$; CAT: $13.2 \pm 1.9\%$; Gpx: $32.1 \pm 6.8\%$ and GST: $53.7 \pm 3.1\%$) at 4 h ($P < 0.05$). As expected, Dex and Indo inhibited all the antioxidant enzymes at this time (% of inhibition SOD: $14.6 \pm 6.0\%$; Indo: $8.9 \pm 2.6\%$; CAT: $17.4 \pm 3.7\%$; Indo: $15.8 \pm 5.7\%$; Gpx: $40.0 \pm 2.3\%$; Indo: $38.5 \pm 0.6\%$; and GST: $52.6 \pm 7.7\%$; Indo: $25.7 \pm 2.0\%$) ($P < 0.05$) (Table 2).

On the second (48 h) phase MMF at the same dose also inhibited the following antioxidants enzymes (% of inhibition SOD: $18.5 \pm 4.8\%$; CAT: $18.4 \pm 5.5\%$; Gpx: $35.1 \pm 3.0\%$ and GST: $30.2 \pm 4.8\%$) ($P < 0.05$). Dex and Indo also inhibited all studied parameters (% of inhibition SOD: $15.7 \pm 4.1\%$; Indo: $13.3 \pm 3.9\%$; CAT: $22.7 \pm 4.5\%$; Indo: $13.5 \pm$

Table 1
Effects of mycophenolate mofetil (MMF) on cell migration and exudation in both (4 h and 48 h) phases of the inflammatory reaction induced by carrageenan, in mice.

Groups/dose (mg/kg)	Leukocytes ($\times 10^6$)	Neutrophils ($\times 10^6$)	Mononuclears ($\times 10^6$)	Exudate ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
4 h				
S ^a	1.65 ± 0.32	0.37 ± 0.12	1.27 ± 0.19	1.69 ± 0.19
Cg ^b	5.60 ± 0.49	4.24 ± 0.56	1.35 ± 0.17	10.63 ± 0.57
Dex (0.5) ^b	1.90 ± 0.21*	0.93 ± 0.19*	0.97 ± 0.07	6.72 ± 0.42**
Indo (5.0) ^b	3.17 ± 0.30**	1.93 ± 0.20**	1.22 ± 0.17	6.02 ± 0.97**
MMF (10) ^b	5.30 ± 0.63	3.68 ± 0.48	1.61 ± 0.30	9.67 ± 0.70
MMF (50) ^b	5.05 ± 0.38	3.37 ± 0.49	1.68 ± 0.24	9.89 ± 0.71
MMF (100) ^b	2.70 ± 0.19**	1.64 ± 0.30**	1.05 ± 0.06	7.89 ± 0.28**
MMF (200) ^b	2.65 ± 0.62**	1.55 ± 0.35**	1.10 ± 0.29	8.00 ± 0.26**
48 h				
S ^a	1.65 ± 0.32	0.37 ± 0.12	1.27 ± 0.19	1.69 ± 0.19
Cg ^b	10.65 ± 1.17	2.33 ± 0.29	8.29 ± 1.24	11.26 ± 0.12
Dex (0.5) ^b	4.15 ± 0.25**	0.70 ± 0.10**	3.45 ± 0.25**	8.35 ± 0.58*
Indo (5.0) ^b	4.76 ± 0.90*	1.00 ± 0.19*	3.76 ± 0.59**	7.98 ± 0.79*
MMF (10) ^b	8.30 ± 0.44	2.15 ± 0.20	6.15 ± 0.29	9.31 ± 0.85
MMF (50) ^b	8.32 ± 0.56	1.92 ± 0.07	6.40 ± 0.40	9.09 ± 0.37
MMF (100) ^b	4.27 ± 0.62**	2.05 ± 0.44	2.22 ± 0.25**	4.92 ± 1.58**
MMF (200) ^b	3.91 ± 0.83**	1.90 ± 0.41	2.01 ± 0.47**	6.07 ± 0.39**

S, animals treated with sterile phosphate buffer saline (PBS pH 7.6); Cg, animals treated with only carrageenan (1%); MMF, animals pre-treated with mycophenolate mofetil (10–200 mg/kg); Dex, animals pre-treated with Dexamethasone (0.5 mg/kg); Indo, animals pre-treated with Indomethacin (5 mg/kg). N = 5 animals.

^a Administered by intraperitoneal route.

^b Administered by intraperitoneal route.

^c Administered by oral route.

* P < 0.05.

** P < 0.01.

4.1%; Gpx: Dex: 16.6 ± 4.1%; Indo: 23.4 ± 2.1%; and GST: Dex: 52.6 ± 7.7%; Indo: 25.7 ± 2.0% (P < 0.05) (Table 2).

4.4. Lipoperoxidation levels

Mycophenolate mofetil (100 mg/kg), caused a marked reduction in TBARS levels by 22.6 ± 5.6%; at 4 h and 22.8 ± 3.0% at 48 h of the inflammatory process induced by carrageenan (P < 0.05). The similar manner, Dex and Indo also inhibited this same inflammatory parameter by 25.4 ± 5.1%, and 27.5 ± 3.8%, at 4 h and by 20.0 ± 2.1, and 40.5 ± 0.9 at 48 h, respectively (P < 0.05) (Table 2).

5. Discussion

The oxidative stress has been shown to play a critical role in the acute and chronic inflammatory response such as lung injury with the concomitant enhancement of the lipid peroxidation [3,19]. In this regard, it is well known that the antioxidant responses found in different diseases depend on the severity, extension and/or the long-term of the chronic inflammatory condition [20]. Leukocyte activation prior to the cell responses involved in the acute inflammatory process such as neutrophils, promotes the release of several types of ROS, such as hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals [21]. A similar event occurs through the activation of mononuclear cells that are involved primarily in the chronic inflammatory response [2].

ROS-detoxifying enzymes are crucial for cellular redox balance regulation in the physiological and inflammatory processes. Among them, SOD, CAT, Gpx and GST are the most important enzymatic agents involved in such processes. Steiling et al. [22] demonstrated that SOD, CAT and Gpx mRNA were up-regulated in the inflammatory process induced by needle scarification in a murine model of skin inflammation. Moreover, McCunney [23] showed that ROS release is an important event involved in the chronic inflammatory disease such as asthma. In addition, glutathione S-transferase (GST) activity was significantly elevated in these patients. Moreover, inflammatory conditions decrease the antioxidant capacity of the organism by affecting a variety of endogenous ROS scavenging proteins and

enzymes [24]. Therefore, control of ROS levels is also required to attenuate the inflammatory severity and tissue damage.

In the present study we found that mycophenolate mofetil exerts an acute and important anti-inflammatory effect in an inflammation model caused by carrageenan. These results allowed us to characterize a marked inhibitory profile upon leukocyte influx, regarding both neutrophils and mononuclears, besides a significant exudation inhibition. This effect was also associated with a significant decrease in the activity of important enzymes such as SOD, CAT, Gpx, and GST, which participate on the main defense system against oxidative stress induced by ROS overgeneration. Since Dex, Indo and MMF presented similar effects profile. It is possible that these drugs may be acting via common and distinct pathways. Our results are in accordance to the literature, since studies reported by Krütz et al. [25] demonstrated that MMF exerts an important antioxidant effect by inhibiting endothelial NADPH-oxidase activity and superoxide radical formation in human endothelial cells from the umbilical vein (HUVECs). This effect could be attributed to the oxidative stress attenuation by lowering of ROS production [25]. Moreover, Van den Branden et al. [26] also showed a significant decrease in CAT and SOD activities when mice were treated with MMF in the experimental model of renal failure induced by adriamycin. Saad et al. [27] also showed a significant decrease in Gpx and GSH activities in the inflammatory process in the nephrotoxicity model induced by cisplatin-induced nephrotoxicity in rats treated with MMF.

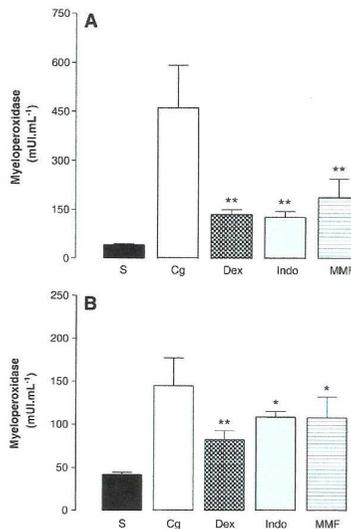


Fig. 1. Effects of mycophenolate mofetil (100 mg/kg, p.o.) upon myeloperoxidase activity on the first (4 h) (A) and late (48 h) (B) phases of inflammatory response induced by carrageenan (1%; i.p.), in the mouse model of pleurisy. S = animals pre-treated with sterile phosphate buffer saline (PBS, pH 7.6); Cg = animals treated only with carrageenan; MMF = animals pre-treated with mycophenolate mofetil (100 mg/kg, p.o.); Dex = animals pre-treated with Dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.); Indo = animals pre-treated with Indomethacin (5 mg/kg, i.p.). (*P < 0.05 and **P < 0.01, N = 5 animals.

Table 2
Effects of mycophenolate mofetil (MMF) on antioxidants enzymes activities and TBARS levels in both (4 h and 48 h) phases of the inflammatory reaction induced by carrageenan, in mice.

Groups/dose (mg/kg)	SOD (USOD mL ⁻¹)	CAT (mmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	GPx (μmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	GST (μmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	TBARS (mmol mL ⁻¹)
4 h					
S ^a	79.2 ± 4.7	7.8 ± 0.3	0.84 ± 0.04	22.7 ± 1.5	5.92 ± 0.5
Cg ^a	92.0 ± 1.6	10.1 ± 0.4	2.27 ± 0.05	70.7 ± 10.4	10.42 ± 1.2
Dex (0.5) ^b	78.5 ± 5.6 ^c	8.4 ± 0.4 ^a	1.36 ± 0.05 ^{**}	33.5 ± 5.5 ^{**}	8.02 ± 0.5 ^{**}
Indo (5.0) ^b	83.7 ± 2.4 ^a	8.5 ± 0.6 ^a	1.39 ± 0.02 ^{**}	52.5 ± 1.4 ^a	7.80 ± 0.4 ^{**}
MMF (100) ^c	77.2 ± 3.2 ^{**}	8.8 ± 0.2 ^a	1.55 ± 0.15 ^{**}	32.7 ± 2.2 ^{**}	8.32 ± 0.6 ^{**}
48 h					
S ^a	79.2 ± 4.7	7.8 ± 0.3	0.84 ± 0.04	22.7 ± 1.5	5.92 ± 0.5
Cg ^a	101.2 ± 3.0	9.7 ± 0.4	2.22 ± 0.09	81.0 ± 4.6	19.05 ± 0.5
Dex (0.5) ^b	85.2 ± 4.2 ^a	7.5 ± 0.4 ^{**}	1.85 ± 0.09 ^{**}	62.5 ± 4.9 ^{**}	15.20 ± 0.4 ^{**}
Indo (5.0) ^b	87.7 ± 4.0 ^a	8.3 ± 0.3 ^a	1.70 ± 0.05 ^{**}	69.5 ± 1.0 ^a	11.30 ± 0.2 ^{**}
MMF (100) ^c	82.5 ± 4.8 ^a	7.9 ± 0.5 ^a	1.44 ± 0.03 ^{**}	56.5 ± 3.7 ^{**}	14.70 ± 0.6 ^{**}

S: animals treated with sterile phosphate buffer saline (PBS pH 7.6); Cg: animals treated with only carrageenan (1%; ipl.); MMF: animals pre-treated with mycophenolate mofetil (100 mg/kg); Dex: animals pre-treated with Dexamethasone (0.5 mg/kg). N = 5 animals.

^a Administered by intraperitoneal route; Indo: animals pre-treated with Indomethacin (5 mg/kg).

^b Intraperitoneal route.

^c Administered by oral route.

^{**} P < 0.05.

^{**} P < 0.01.

A primary consequence of oxidative stress and reactive species overgeneration caused by inflammatory process is the oxidation of proteins and lipids or the oxidative degeneration of lipids [2]. In the present study, MMF treatment also significantly decreased TBARS levels and myeloperoxidase activity, and these effects could be explained, at least in part, by the MMF ability to decrease reactive species that are produced by myeloperoxidase release when leukocytes were activated in the inflammatory process induced by carrageenan [28]. These results are also in accordance with those from other authors, which demonstrated that MMF was able to significantly decrease TBARS levels in the murine model of kidney inflammation induced by doxorubicin [26]. In addition, Farivar et al. [29] also demonstrated the anti-inflammatory effect of MMF by decreasing myeloperoxidase activity in the inflammatory injury induced by ischemia-reperfusion in rats.

Clinical studies also showed that patients with psoriasis and rheumatoid arthritis treated with MMF presented a significant reduction in urinary and plasma lipoperoxidation, thus reflecting attenuation of the related oxidative stress [30]. Finally, De Cal et al. [31] showed in a single-center cohort study that transplanted patients have significant decrease in the oxidation protein products when treated with MMF, which also indirectly reflects a decrease in reactive species generation.

6. Conclusion

In conclusion, mycophenolate mofetil exerts an important anti-inflammatory effect, which might be attributed, at least in part, by blocking reactive species generation and consequently oxidative stress attenuation in the mouse pleurisy model. However, the limitations observed in this model warrant the continuation of studies on the antioxidant effects of mycophenolate mofetil.

References

- [1] Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telsler J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44–84.
- [2] Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(10):1713–65.
- [3] Cieniewicz J, Trivedi S, Kleberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(3):456–68.
- [4] Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (γ)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 2002;14(11):879–97.

- [5] Sinclair A, Appel G, Dooley MA, Ginzler E, Isenberg D, Jayne D, et al. Mycophenolate mofetil as induction and maintenance therapy for lupus nephritis: rationale and protocol for the randomized, controlled Aspreva Lupus Management Study [ALMS]. *Lupus* 2007;16(12):972–80.
- [6] Hennes EM, Ou YH, Schamm C, Denzer U, Bugigisch P, Wiegand C, et al. Mycophenolate mofetil as second line therapy in autoimmune hepatitis? *Am J Gastroenterol* 2008;103(12):3063–70.
- [7] Arns W, Cibrik DM, Walker RG, Mourad G, Budde K, Mueller EA, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplant patients treated with mycophenolate mofetil: review of the literature. *Transplantation* 2006;82(8):1094–12.
- [8] Orvis AK, Wesson SK, Breza Jr TS, Church AA, Mitchell CL, Watkins SW. Mycophenolate mofetil in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2009;60(2):183–99.
- [9] Sahin GM, Sahin S, Kantarci G, Ergin H. Mycophenolate mofetil treatment for therapy-resistant glomerulopathies. *Nephrology (Carlton)* 2007;12(3):285–8.
- [10] Buhacscu I, Cowie A, Levy J. Systemic vasculitis: still a challenging disease. *Am J Kidney Dis* 2005;46(2):173–85.
- [11] Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol* 1996;118(3):811–9.
- [12] Rao TS, Currie JJ, Shaffer AL, Isalson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)- and tetradecanoylphorbol acetate (tpa)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 1993;17(6):723–41.
- [13] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(10):3170–5.
- [14] Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, Koch OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 1983;227(2):534–41.
- [15] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984;204(1):234–54.
- [16] Flohé L, Günzel WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105(1):114–21.
- [17] Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1976;249(1):7130–9.
- [18] Bird RP, Draper AH. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol* 1984;90(1):105–10.
- [19] MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001;429(1–3):195–207.
- [20] Guttridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899(1):136–47.
- [21] Peake I, Suzuki K. Neurophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exerc Immunol Rev* 2004;10(1):329–41.
- [22] Stelling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 1999;247(2):484–94.
- [23] McCumey RJ. Asthma, genes, and air pollution. *J Occup Environ Med* 2005;47(12):1285–91.
- [24] Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *ILMBB Life* 2000;50(4–5):279–89.
- [25] Krötz F, Keller M, Derflinger S, Schmid H, Gloe T, Bassermann F, et al. Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension* 2007;49(1):201–8.
- [26] Van den Branden C, Ceysens B, Pauwels M, Van Wichelen G, Heirman L, Jie N, et al. Effect of mycophenolate mofetil on glomerulosclerosis and renal oxidative stress in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2005;95(3):93–9.

- [27] Saad SY, Arafah MM, Najjar TA. Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59(4):455–60.
- [28] Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(7):995–1014.
- [29] Farivar AS, MacKinnon-Patterson B, Barnes AD, Mulligan MS. The effect of anti-inflammatory properties of mycophenolate mofetil on the development of lung reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(12):2235–42.
- [30] Herrera J, Ferrebuz A, MacGregor EC, Rodriguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil treatment improves hypertension in patients with psoriasis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(12 Suppl 3):218–25.
- [31] De Cal M, Silva S, Cruz D, Basso F, Corradi V, Lentini F, et al. Oxidative stress and 'monocyte reprogramming' after kidney transplant: a longitudinal study. *Blood Purif* 2008;26(1):105–10.

ANEXO 6

Artigo submetido

Experimental Lung Research



Evidence of an anti-inflammatory effect of mycophenolate mofetil in a murine model of pleurisy

Journal:	<i>Experimental Lung Research</i>
Manuscript ID:	UELR-2010-0100
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	20-Oct-2010
Complete List of Authors:	Dalmarco, Eduardo; Regional University of Blumenau, Pharmaceutical Sciences Córdova, Caio; Regional University of Blumenau, Pharmaceutical Sciences Fröde, Tânia; Federal University of Santa Catarina,, Clinical Analysis
Keywords:	mycophenolate mofetil, anti-inflammatory activity, leukocytes, tumour necrosis factor- α , interleukin- 1β , vascular endothelial growth factor- α , interleukin-17A

SCHOLARON
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Evidence of an anti-inflammatory effect of mycophenolate mofetil in a murine model of pleurisy

Running head: Anti-inflammatory effect of mycophenolate mofetil.

Eduardo Monguilhott Dalmarco^a, Caio Maurício Mendes de Córdova^a, and Tânia Silvia Fröde^{b,*}

^a*Department of Pharmaceutical Science, Centre of Health Sciences, Regional University of Blumenau, Itoupava Seca, Blumenau, SC, Brazil*

^b*Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil*

*Corresponding author: T.S. Fröde, *Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil, 88040-970, fax: (55) 48 32 44 09 36, e-mail address: saleh@ccs.ufsc.br*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60**ABSTRACT**

A promising therapeutic approach to reducing inflammation is to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines (e.g., tumour necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β), vascular endothelial growth factor alpha (VEGF- α) and, as shown more recently, interleukin-17 (IL-17)). In the present study, we have demonstrated the anti-inflammatory effects of MMF in *in vivo* experiments and have investigated the mechanism of action underlying those effects. Results: Oral administration of MMF significantly inhibited leukocyte influx during the first (4 h) and second (48 h) phases of inflammation in a mouse model of pleurisy caused by carrageenan ($P < 0.01$). In accordance, MMF suppressed protein levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A ($P < 0.01$). This inhibitory effect was due to down-regulation of mRNA expression for these pro-inflammatory cytokines ($P < 0.01$). These results provide evidence of MMF-mediated inhibition of pro-inflammatory cytokines, and these anti-inflammatory effects are assumed to result mainly from the inhibition of the synthesis and release of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A from activated leukocytes. These findings suggest that MMF might be an applicable therapeutic in the regulation of the inflammatory response – a response in which the humoral system plays a pivotal role.

KEYWORDS: mycophenolate mofetil, anti-inflammatory activity, leukocytes, tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β , vascular endothelial growth factor- α , interleukin-17A.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The inflammatory response involves a complex signals from intercellular promoting the cytokine release. Activated inflammatory cells subsequently synthesise and secrete a variety of pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β), vascular endothelial growth factor alpha (VEGF- α) and, as shown more recently, interleukin-17 (IL-17), which is released by a novel subset of T-helper cells that are known to be involved in both acute and chronic inflammatory responses [1-3]. The suppression of these pro-inflammatory mediators has been found to reduce the severity of the inflammatory reaction [4].

Despite much research into inflammatory diseases, no drugs with favourable safety profiles are available yet for their treatment. Therefore, studies have been ongoing to develop anti-inflammatory agents that are efficacious and safer than the drugs that are currently available. In particular, the current understanding of anti-inflammatory therapeutics suggests that effective inhibitors of the inflammatory pathway are most likely to inhibit synthesis and/or secretion of inflammatory mediators.

Mycophenolate mofetil (MMF), the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (MPA), is a powerful immunosuppressant agent that is useful for the prevention of acute organ graft rejection in, for example, kidney, heart and liver transplantation [5]. Mycophenolic acid, a metabolite of MMF, depletes guanosine triphosphate pools in lymphocytes and monocytes and suppresses *de novo* synthesis of purines, thereby exerting selective and reversible anti-proliferative effects on these cells.

Experimental studies have demonstrated the efficacy of MMF in inhibiting murine autoimmune uveoretinitis and in delaying the development of lupus [6]. In humans, MMF therapy is beneficial in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases such as

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

glomerulopathies [7], systemic lupus erythematosus [8], vasculitis [9], myasthenia gravis [10], Wegener's granulomatosis [11], rheumatoid arthritis [12] and psoriasis [13]. However, the anti-inflammatory mechanism of action of MMF has not yet been completely elucidated.

In this study, we sought to evaluate the anti-inflammatory effect of MMF on leukocyte influx and on levels of important pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A, in the first (4 h) and second (48 h) phases of the inflammatory reaction in a mouse model in which pleurisy is induced with a phlogistic agent (carrageenan). In particular, we analysed cytokine mRNA levels to determine if MMF could inhibit their synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Swiss mice, weighing 18 - 25 g, were housed under standard conditions (room at a constant temperature of 22 \pm 2°C, with alternating 12-h periods of light and darkness and 50 - 60% humidity) and were fed a standard mouse diet with water *ad libitum*. Each study group consisted of five animals; unless otherwise stated, the number of animals was the minimum necessary to demonstrate a consistent effect of the drug treatments. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the Regional University of Blumenau (License number 026/2006), and all experiments were performed in accordance with the principles stated in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Brazilian College of Animal Experimentation; COBEA).

Induction and analysis of pleurisy

Pleurisy was induced by a single intrapleural injection (i.pl.) of 0.1 mL of sterile saline (NaCl, 0.95%) plus carrageenan (Cg, 1%) [14]. After killing the animals with an overdose of pentobarbital, the thorax was opened, and the pleural cavity was washed with 1.0 ml of sterile phosphate-buffered saline [PBS, pH 7.6; composition: NaCl (130 mM), Na₂HPO₄ (5 mM), KH₂PO₄ (1 mM), and distilled water (1000 mL) containing heparin (20 IU/mL)].

Initially, for determination of the dose to be used in subsequent experiments, a dose-response curve for oral (p.o.) doses of MMF (1, 10, 50, 100 and 200 mg/kg) was obtained. A group of animals was treated 0.5 h before pleurisy induction with different doses of MMF, and the animals' pleural fluid leukocyte count was analysed 4 h and 48 h after carrageenan injection. Based on the results from this protocol which MMF caused a significant inhibition of both leukocytes and exudation into the mouse pleural cavity, the dose (100 mg/kg) of MMF was chosen for analysis of the time course profile of this drug effects and of its modulation of inflammatory parameters. In both phases (4 h and 48 h) of this inflammation, MMF was only effective at inhibiting leukocyte influx when it was given 0.5 h before carrageenan injection (results not shown). Thus, the dose of MMF (100 mg/kg, p.o.), administered 0.5 h before carrageenan induction, was chosen to analyse the effect of this drug on mRNA and protein levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A in both phases (4 h and 48 h) of the inflammatory reaction in the carrageenan mouse model of pleurisy.

Following this protocol, several samples of extravasated fluid from mouse pleural cavities were collected to determine levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A; the

1
2
3
4 cytokines levels were analysed immediately on the day of the experiments. Additionally,
5
6 in another set of experiments, further analysis was performed to determine the effect of
7
8 MMF on mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A in the lungs. For both (4 h
9
10 and 48 h) phases, the potent anti-inflammatory agents dexamethasone (Dex),
11
12 indomethacin (Indo) and ibuprofen (Ibu) were used as reference drugs. Animals were
13
14 pre-treated (0.5 h) with Dex (0.5 mg/kg, i.p.), Indo (5 mg/kg, i.p.) or Ibu (30 mg/kg, p.o.),
15
16 and the same inflammatory parameters were evaluated 4 h and 48 h after treatment.
17
18

19
20 The following groups of animals were used in the experiments: 1) animals treated
21
22 only with i.pl. sterile saline (NaCl 0.95%) (N = 5), which was considered as the
23
24 negative-control group; 2) animals treated only with carrageenan (1%, i.pl.) (N = 5),
25
26 which was considered as the positive-control group; 3) animals treated with Dex (0.5
27
28 mg/kg, i.p.) 0.5 h before carrageenan (N = 5); 4) animals treated with Indo (5 mg/kg, i.p.)
29
30 plus carrageenan (N = 5); 5) animals treated with Ibu (30 mg/kg, p.o.) plus carrageenan
31
32 (N = 5); and 6) animals treated with MMF (100 mg/kg, p.o.) plus carrageenan (N = 5).
33
34
35
36
37
38

39 **Measurement of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A protein levels**

40
41 The protein levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A in the mouse pleural cavity fluid
42
43 were assayed by a two-side sandwich-like immunosorbent assay (ELISA) using
44
45 commercially available kits with specific monoclonal antibodies for each cytokine,
46
47 according to the manufacturers' instructions. The concentration ranges detected by these
48
49 assays were as follows: TNF- α (31.3 - 2000 pg/mL), IL-1 β (11.72 - 750 pg/mL), VEGF- α
50
51 (62.5 - 4000 pg/mL) and IL-17A (4.0 - 500 pg/mL). The intra- and inter-assay coefficients
52
53 of variation (CV) were as follows: intra CV: TNF- α = 7.8 \pm 0.9%, IL-1 β = 6.2 \pm 0.4%,
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 VEGF- α = 6.0 \pm 2.1% and IL-17A = 7.5 \pm 1.7%; inter CV: TNF- α = 9.6 \pm 2.1%, IL-1 β = 5.1
4
5 \pm 0.6%, VEGF- α = 5.1 \pm 0.7% and IL-17A = 6.2 \pm 0.9%. The sensitivities of the assays
6
7 were as follows: TNF- α = 5.0 pg/mL, IL-1 β = 1.67 pg/mL, VEGF- α = 10.98 pg/mL and IL-
8
9 17A = 4.0 pg/mL. All cytokine concentrations were estimated by means of colorimetric
10
11 measurement at 450 nm on an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ,
12
13 USA) and by interpolation from a specific standard curve for each cytokine.
14
15
16
17
18

19 **Measurement of mRNA expression levels for TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A**

20 **Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**

21
22
23 Total RNA was extracted from mouse lung tissue samples (200 mg) using Trizol[®] (1000
24
25 μ L) plus chloroform (200 μ L) and 75% isopropyl alcohol (500 μ L, v/v). After
26
27 centrifugation for 15 min at 12,000 x g at 4°C, the precipitate was washed once with
28
29 75% ethanol (1000 μ L, v/v). The pellets were dissolved in a 0.01% DEPC
30
31 (diethylpyrocarbonate)/water solution (100 μ L, v/v), and the RNA concentration was
32
33 determined by measuring absorbance at 260 nm on a spectrophotometer (GBC-916,
34
35 GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia). Total RNA (1 μ g/ μ L) was mixed with
36
37 DNase Grade I[®] (1 μ L), according to the manufacturer's instructions. Then DNase-
38
39 treated RNA (500 ng) was added to a solution containing Oligo dT (12-18)[®] (1 μ L) and
40
41 reverse transcriptase (1 μ L), according to the manufacturer's protocol. All reactions were
42
43 performed in a thermocycler (Biocycler MJ96+, Biosystems, São José dos Pinhais, PR,
44
45 Brazil). The primers for specific genes were designed based on the sequences
46
47 published on GenBank and on the PCR conditions used in our protocols (Table 1).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Primers specific for β -actin were used as a reverse transcriptase control (internal
4 control) for PCR analysis.
5
6

7 The PCR products were analysed by electrophoresis using an agarose gel (1%)
8 (BioAmerica Inc., Miami, Florida, USA) stained with ethidium bromide and visualised
9 under UV light (Vilber-Lourmat[®], Photo-Capt System). Final amounts of RT-PCR
10 products for TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A were calculated after normalisation to β -
11 actin expression. Bands were detected and analysed using the Photo-Capt image
12 version 12.4 for Windows[®] to quantify their intensity.
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Drugs and reagents**

23
24 The following drugs were purchased as indicated: mycophenolate mofetil (Cell
25 Cept[®], Roche, Milan, Italy), dexamethasone (Prodome Química e Farmacêutica
26 Ltda., Campinas, SP, Brazil), carrageenan- λ (degree IV), ibuprofen, indomethacin (Sigma
27 Chemical Co., St. Louis, MO, USA), heparin (Liquemine[®], Roche, São Paulo, SP, Brazil),
28 May-Grunwald-Giemsa dye, and Turk's solution (Laborclin, São José dos Pinhais, PR,
29 Brazil), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for quantitative determination of
30 mouse TNF- α (Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA; Cat. N. 559732),
31 mouse IL-1 β , mouse VEGF- α (Immunobiological laboratories Co. Ltd., Fujioka, Gunma,
32 Japan; Cats. N. 27193 and 27102) and mouse IL-17A (eBioscience Inc., San Diego,
33 California, USA; Cat. N. 88-7971). All primers, ethidium bromide, Trizol[®] and DNase
34 grade I[®] were purchased from Invitrogen (Carlsbad, California, USA). The RevertAid H
35 Minus First Strand cDNA synthesis kit was purchased from Fermentas (Burlington,
36 Canada), and PCR-grade agarose was purchased from BioAmerica Inc. (Miami, Florida,
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 USA). Other chemicals and solvents used were of analytical grade and were obtained
4
5 from different commercial sources.
6
7
8
9

10 **Statistical analysis**

11 All values are reported as the mean \pm SEM. Significant differences among experimental
12 groups (raw data) were determined when necessary by student's t-tests or two-way
13 analyses of variance (ANOVA), followed by Dunnett's and Pearson's correlation
14 coefficient tests. P values of less than 0.05 were considered to be indicative of
15 significance.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **RESULTS**

28 **Effects of MMF on leukocyte influx**

29 In the early (4 h) phase of the inflammatory reaction induced by carrageenan, MMF at the
30 doses of 100 and 200 mg/kg significantly decreased the number of leukocytes in the
31 pleural fluid by $51.7 \pm 3.4\%$ and $52.6 \pm 11.1\%$, respectively ($P < 0.01$) (Figure 1A). At the
32 same time point, this drug also significantly reduced neutrophils by $60.9 \pm 3.3\%$ and 63.4
33 $\pm 8.5\%$ ($P < 0.01$) (Figure 1B). Treatment with Dex, Indo and Ibu also inhibited these
34 same inflammatory parameters ($P < 0.01$) (Figures 1A and B).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Regarding the second (48 h) phase of this inflammatory process, MMF (100 and 200
49 mg/kg) also significantly inhibited leukocyte influx by $59.8 \pm 5.8\%$ and $63.0 \pm 7.8\%$ ($P <$
50 0.01) (Figure 2A) and mononuclear cells by $76.1 \pm 3.1\%$, and $75.7 \pm 5.6\%$ ($P < 0.01$)
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(Figure 2B). Again, Dex, Indo and Ibu also inhibited leukocyte and mononuclear cells influxes ($P < 0.05$) (Figures 2A and B).

Effects of MMF on TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A protein levels

To test whether MMF could be implicated in the inhibition of pro-inflammatory cytokines, we analysed the effect of this drug on protein levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A during the first (4 h) and second (48 h) phases of the inflammatory process induced by carrageenan. Treatment with MMF (100 mg/kg) significantly reduced protein levels of TNF- α by $51.1 \pm 9.3\%$ and $77.4 \pm 5.1\%$ ($P < 0.01$), IL-1 β by $39.6 \pm 3.8\%$ and $63.9 \pm 8.3\%$ ($P < 0.01$), VEGF- α by $29.4 \pm 2.2\%$ and $51.1 \pm 7.3\%$ ($P < 0.01$) and IL-17A by $42.8 \pm 1.7\%$ and $32.1 \pm 10.9\%$ ($P < 0.01$), respectively (Table 2). The reference drugs (Dex, Indo and Ibu) also decreased the levels of these pro-inflammatory cytokines ($P < 0.05$) (Table 2).

In both (4 h and 48 h) phases of pleurisy, we observed a positive correlation between the leukocyte influx inhibition caused by MMF treatment and the reduction in the level of each pro-inflammatory cytokine in extravasated fluid (Leuk. vs. TNF- α , $r = 0.96$ and $r = 0.91$; Leuk. vs. IL-1 β , $r = 0.98$ and $r = 0.92$; Leuk. vs. VEGF- α , $r = 0.99$ and $r = 0.92$; and Leuk. vs. IL-17A, $r = 0.98$ and $r = 0.91$) ($P < 0.05$).

Effects of MMF on levels of mRNA expression for TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A

Since MMF caused a significant reduction in the levels of protein for TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A, we also investigated the effect of MMF on these cytokines' mRNA expression patterns in the inflamed lungs of animals pre-treated with MMF. We found that

1
2
3 in both phases (4 h and 48 h) of the inflammatory response caused by carrageenan, MMF
4 (100 mg/kg) significantly reduced the levels of mRNA for TNF- α by $63.0 \pm 1.6\%$ and 39.6
5 $\pm 3.7\%$ ($P < 0.01$) (Figures 3A and 4A), IL-1 β by $53.8 \pm 1.6\%$ and $62.7 \pm 1.8\%$ ($P < 0.01$)
6
7 (Figures 3B and 4B), VEGF- α by $40.3 \pm 2.6\%$ and $56.8 \pm 3.2\%$ ($P < 0.01$) (Figures 3C
8 and 4C) and IL-17A by $58.4 \pm 4.0\%$ and $46.5 \pm 4.8\%$ ($P < 0.01$) (Figures 3D and 4D),
9 respectively. Pre-treatment with Dex, Indo and Ibu also reduced mRNA levels for these
10 cytokines ($P < 0.05$) (Figures 3 and 4). Additionally, a significant positive correlation
11 between leukocyte influx and the levels of mRNA expression for each of the cytokines
12 studied was observed at the 4- and 48-h time points (Leuk. vs. TNF- α mRNA, $r = 0.94$
13 and $r = 0.87$; Leuk. vs. IL-1 β mRNA, $r = 0.91$ and $r = 0.85$; Leuk. vs. VEGF- α mRNA, $r =$
14 0.95 and $r = 0.90$ and IL-17A mRNA, $r = 0.98$ and $r = 0.87$, respectively) ($P < 0.05$).
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 DISCUSSION

32
33
34
35
36 Despite the vast array of commercially available drugs, of which NSAIDs are the most
37 used, continued research efforts are progressing with a goal of discovering drugs that
38 are efficacious and safer than the drugs that are currently available.
39
40
41
42

43 The results demonstrated here provide additional evidence that MMF has important
44 anti-inflammatory effects. Pre-treatment with MMF inhibited the inflammatory response in
45 the mouse model of pleurisy induced by carrageenan, effectively decreasing both acute
46 (4 h) neutrophil and late (48 h) mononuclear cells influxes.
47
48
49
50
51

52 It is important to note that in these experimental protocols, the same dose of MMF
53 (100 mg/kg) was sufficient to inhibit the early (4 h) and late (48 h) phases of carrageenan-
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 induced inflammation.
4

5 Our results are interesting because the pleurisy model, with its bimodal cellular
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
influxes, may be used to test drugs that are candidates to treat chronic inflammation, such
as those targeting asthma and autoimmune diseases, among others [14].

192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
Importantly, although other immunosuppressant drugs such as cyclosporin A,
tacrolimus and metrothexate were more potent in inhibiting leukocyte influx in the same
experimental model, the anti-inflammatory pattern of leukocyte inhibition presented by
MMF was similar in several aspects, by inhibiting cell migration and exudate to the pattern
of these drugs [15-17]. Also, the MMF anti-inflammatory effect was very similar in several
aspects to the effects of Dex and Ibu, but less than that of Indo.

261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
The MMF effect on leukocyte inhibition was also correlated with a decrease in levels
of both protein and mRNA for TNF- α , IL1 β , VGF- α and IL-17A. These findings extend the
hypothesis that the anti-inflammatory effect of MMF was due to the down-regulation of the
production and/or secretion of pro-inflammatory cytokines.

361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
Our results are in accordance with other studies that have demonstrated an effect of
MMF on leukocytes and pro-inflammatory mediators. In this context, MMF administration
caused a significant inhibition of neutrophil migration to the lungs in a rat model of
ischemia/reperfusion injury induced by hilar occlusion [18]. Moreover, Saad et al. (2007)
demonstrated that MMF inhibited mononuclear cells influx to the kidney in rats with
inflammation induced by cisplatin [19].

461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
The inhibitory effect of MMF on leukocyte migration might be explained by studies
reported by Glomsda et al. (2003), who demonstrated that MMF had an inhibitory effect
on monocyte adhesion molecules in *in vitro* studies using human umbilical vein

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

endothelial cells (HUVEC) [20].

It has been reported that MMF decreases levels of TNF- α and IL-1 β in different experimental models such as in the murine model of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), in the rat model of ischemia/reperfusion injury and in the murine macrophages and human monocytes stimulated by lipopolysaccharide (LPS) models [21-23]. Additionally, Farivar et al. (2005) reported that MMF promoted a marked reduction in the expression of EGR1 (a nuclear transcription factor responsible for VEGF- α production) and consequently caused a reduction in lung vascular permeability in a rat model of ischemia/reperfusion injury induced by hilar occlusion [18].

Most of the studies have shown MMF-induced suppression of lymphocytes in the experimental murine model of colitis induced by TNBS [23] and in the rat model of kidney inflammation induced by acetate [24]. However, few studies have revealed the effect of MMF on IL-17A; a notable exception is the study by Von Vietinghoff et al. (2010), who showed that treatment of C57Bl/6 mice with MMF depleted levels of IL-17, and this effect was related to a decrease in neutrophil influx [25].

In conclusion, our results confirm and extend the evidence of MMF-mediated inhibition of important pro-inflammatory cytokines. This anti-inflammatory effect of MMF is hypothesised to result mainly from the inhibition of TNF- α , IL-1 β and VEGF- α . Additionally, this study provides detailed information of the inhibitory effect on IL-17A exerted by MMF, demonstrating that, in addition to the inhibition of pro-inflammatory cytokines, this drug also down-regulates activated lymphocytes, specifically TH17 clones. These findings suggest that MMF might be an applicable therapeutic in the regulation of the inflammatory response, in which the humoral response plays a pivotal role.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Declaration of interest: *The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- [1] Calcagni E, Elenkov I: Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1069:62-76.
- [2] Schiller M, Metze D, Luger TA, Grabbe S, Gunzer M: Immune response modifiers--mode of action. *Exp Dermatol.* 2006;15:331-341.
- [3] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S: The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol.* 2008;20:1361-1368.
- [4] Stow JL, Ching Low P, Offenhäuser C, Sangermani D: Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology.* 2009;214:601-614.
- [5] Villarroel MC, Hidalgo M, Jimeno A: Mycophenolate mofetil: An update. *Drugs Today (Barc).* 2009;45:521-532.
- [6] Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y: Mycophenolate mofetil in animal models of autoimmune disease. *Lupus.* 2005;14:s12-16.
- [7] Sahin GM, Sahin S, Kantarci G, Ergin H: Mycophenolate mofetil treatment for therapy-resistant glomerulopathies. *Nephrology (Carlton).* 2007;12:285-288.
- [8] Sinclair A, Appel G, Dooley MA, Ginzler E, Isenberg D, Jayne D, Wofsy D, Solomons N: Mycophenolate mofetil as induction and maintenance therapy for lupus nephritis: rationale and protocol for the randomized, controlled Aspreva Lupus Management Study (ALMS). *Lupus* 2007;16:972-980.
- [9] Buhaescu I, Covic A, Levy J: Systemic vasculitis: still a challenging disease. *Am J Kidney Dis.* 2005;46:173-185.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- [10] Heatwole C, Ciafaloni E: Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: a clear and present controversy. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4:1203-1209.
- [11] Antoniu SA: Treatment options for refractory Wegener's granulomatosis: a role for rituximab? *Curr Opin Investig Drugs.* 2007;8:927-932.
- [12] Saketkoo LA, Espinoza LR: Rheumatoid arthritis interstitial lung disease: mycophenolate mofetil as an antifibrotic and disease-modifying antirheumatic drug. *Arch Intern Med.* 2008;168:1718-1719.
- [13] Orvis AK, Wesson SK, Breza TS Jr, Church AA, Mitchell CL, Watkins SW: Mycophenolate mofetil in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60:183-199.
- [14] Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS: Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol.* 1996;118:811-819.
- [15] Dalmarco EM, Fröde TS, Medeiros YS: Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm.* 2002;11:299-306.
- [16] Dalmarco EM, Fröde TS, Medeiros YS: Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transpl Immunol.* 2004;12:151-157.
- [17] Pereira R, Medeiros YS, Fröde TS: Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. *Transpl Immunol.* 2006;16:105-111.
- [18] Farivar AS, MacKinnon-Patterson B, Barnes AD, Mulligan MS: The effect of anti-inflammatory properties of mycophenolate mofetil on the development of lung reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:2235-2242.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- [19] Saad SY, Arafah MM, Najjar TA: Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59:455-460.
- [20] Glomsda BA, Blaheta RA, Hailer NP: Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant Mycophenolate mofetil. *Spinal Cord.* 2003;41:610-619.
- [21] Jonsson CA, Carlsten H: Mycophenolic acid inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses production of pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, and LDH in macrophages. *Cell Immunol.* 2002;216:93-101.
- [22] Weimer R, Mytilineos J, Feustel A, Preiss A, Daniel V, Grimm H, Wiesel M, Opelz G: Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes: effects on monokine secretion and antigen presentation in long-term renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003;75:2090-2099.
- [23] Lee J, Kim MS, Kim EY, Park HJ, Chang CY, Park KS, Jung DY, Kwon CH, Joh JW, Kim SJ: Mycophenolate mofetil promotes down-regulation of expanded B cells and production of TNF-alpha in an experimental murine model of colitis. *Cytokine.* 2008;44:49-56.
- [24] Bravo Y, Quiroz Y, Ferrebuz A, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B: Mycophenolate mofetil administration reduces renal inflammation, oxidative stress, and arterial pressure in rats with lead-induced hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:616-623.
- [25] Von Vietinghoff S, Ouyang H, Ley K: Mycophenolic acid suppresses granulopoiesis by inhibition of interleukin-17 production. *Kidney Int.* 2010;78:79-88.

Legends

FIGURE 1 Effects on leukocytes (A) and neutrophils (B) of different doses of mycophenolate mofetil (1 - 200 mg/kg, p.o.) administered 0.5 h before carrageenan in the early (4 h) phase of inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. S: animals treated only with sterile saline (NaCL 0.95%) (negative control group), Cg: animals treated only with carrageenan (1%, i.pl., positive control group), Dex: animals pre-treated (0.5 h) with dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.), Indo: animals pre-treated (0.5 h) with indomethacin (5 mg/kg, i.p.), Ibu: animals pre-treated (0.5 h) with ibuprofen (30 mg/kg, p.o.). N = 5 animals. *P < 0.05 and **P < 0.01.

FIGURE 2 Effects on leukocytes (A) and neutrophils (B) of different doses of mycophenolate mofetil (1 - 200 mg/kg, p.o.) administered 0.5 h before carrageenan in the late (48 h) phase of inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. S: animals treated only with sterile saline (NaCL 0.95%) (negative control group), Cg: animals treated only with carrageenan (1%, i.pl., positive control group), Dex: animals pre-treated (0.5 h) with dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.), Indo: animals pre-treated (0.5 h) with indomethacin (5 mg/kg, i.p.), Ibu: animals pre-treated (0.5 h) with ibuprofen (30 mg/kg, p.o.). N = 5 animals. **P < 0.01.

FIGURE 3 Effect of mycophenolate mofetil (100 mg/kg, p.o.), administered 0.5 h before carrageenan, on levels of expression of mRNA for TNF- α (A), IL-1 β (B), VEGF- α (C) and IL-17A (D) in the early (4 h) phase of the inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. S: animals treated only with sterile saline (NaCL 0.95%) (negative control group), Cg: animals treated only with carrageenan (1%, i.pl., positive control group), Dex: animals pre-treated (0.5 h) with dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.), Indo: animals pre-treated (0.5 h) with indomethacin (5 mg/kg, i.p.), Ibu: animals pre-treated (0.5 h) with ibuprofen (30 mg/kg, p.o.). N = 5 animals. The inset represents the ethidium bromide-stained agarose gel allows visualization of the RT-PCR product for each cytokine mRNA expression. *P < 0.05 and **P < 0.01.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE 4 Effect of mycophenolate mofetil (100 mg/kg, p.o.), administered 0.5 h before carrageenan, on levels of expression of mRNA for TNF- α (A), IL-1 β (B), VEGF- α (C) and IL-17A (D) in the late (48 h) phase of the inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. S: animals treated only with sterile saline (NaCl 0.95%) (negative control group), Cg: animals treated only with carrageenan (1%, i.pl., positive control group), Dex: animals pre-treated (0.5 h) with dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.), Indo: animals pre-treated (0.5 h) with indomethacin (5 mg/kg, i.p.), Ibu: animals pre-treated (0.5 h) with ibuprofen (30 mg/kg, p.o.). N = 5 animals. The inset represents the ethidium bromide-stained agarose gel allows visualization of the RT-PCR product for each cytokine mRNA expression. **P < 0.01.

TABLE 1 The primers and conditions used in RT-PCR reactions.

Gene	Primers	Amplicon (pb)	PCR Cycles	Temp. (°C) of desaturating	Temp. (°C) of annealing	Temp (°C) of extension	GenBank Register
β-actin	CCAACCGTGAAMAAGATGACC GCAGTAATCTCTTTCTGCATCC	606	30	95	52	72	BC138614.1
TNF-α	CTGGGAOAGTGAOCTGGACT GCACCTCAGGGAAAGAGTCTG	204	36	95	50	72	BC137720.1
IL-1β	CAGGCAGGACAGTATCACTCA AGGCCACAGGATATTTTGTCCG	350	35	95	53	72	BC11437.1
VEGF-α	ACCCGTGACTGAGGTTTGAC TTTCTTGGCGCTTTTCGTTTTT	199	36	95	56	72	NC000083.5
IL-17A	TCTGTGATGCTGTTGCTGCT CGTGGAAACGGTTGAGGTAAGT	195	38	95	48	72	BC119309.1

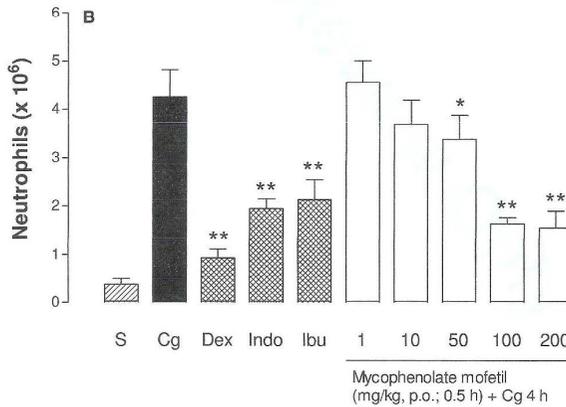
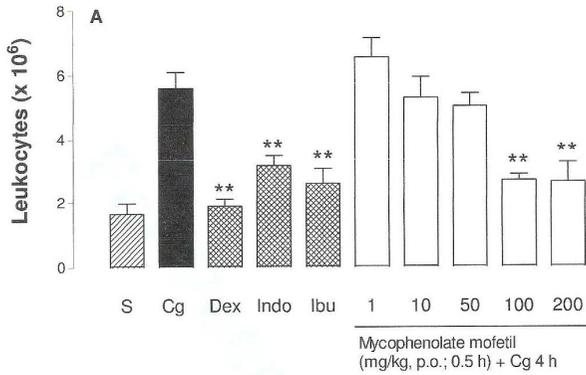
All PCR reactions were performed using a one period of 5 min. at 95° C. The cycles were followed by a period of 7 min. at 72° C.

TABLE 2 Effects of Mycophenolate mofetil (MMF) on the protein levels of TNF- α , IL-1 β , VEGF- α and IL-17A in both (4 h and 48 h) phases of the inflammatory reaction induced by carrageenan, in mice.

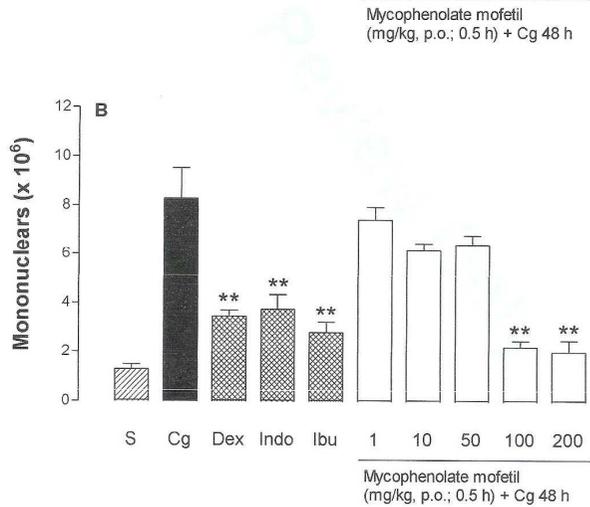
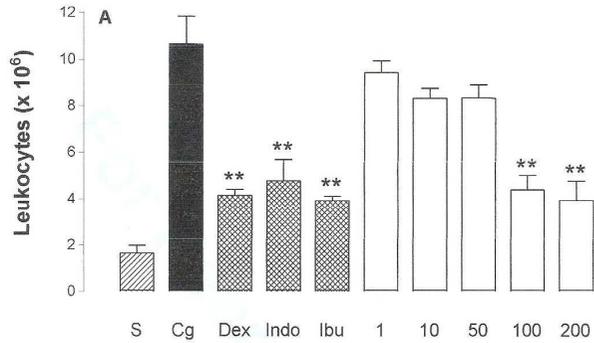
Groups/doses (mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	VEGF- α (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)
4 h				
S ^a	45.2±4.8	70.7±9.4	365.5±14.6	57.4±10.4
Cg ^a	2944.8±378.7	1156.0±118.9	1110.4±127.9	846.0±63.0
Dex (0.5) ^c	1375.6±270.3**	516.0±47.2**	702.6±19.0**	171.8±16.0**
Indo (5.0) ^c	1553.1±243.0*	763.5±125.0**	727.9±4.4**	124.0±10.8**
Ibu (30.0) ^b	656.6±72.1**	499.5±36.0**	360.4±14.6**	375.8±27.0**
MMF (100) ^b	1439.0±273.6**	696.8±44.1**	783.7±24.9**	482.3±14.7**
48 h				
S ^a	45.2±4.8	70.7±9.4	365.5±14.6	57.4±10.4
Cg ^a	495.2±30.1	328.5±15.0	2362.9±362.9	353.6±12.5
Dex (0.5) ^c	88.4±11.7**	139.7±9.4**	1475.7±134.6*	164.8±12.5**
Indo (5.0) ^c	171.0±37.0**	145.4±32.9**	994.1±70.2**	255.9±47.2*
Ibu (30.0) ^b	99.6±6.1**	107.4±7.3**	493.9±21.7**	250.6±29.4*
MMF (100) ^b	111.6±25.2**	117.8±27.3**	1153.8±86.3**	240.0±38.6*

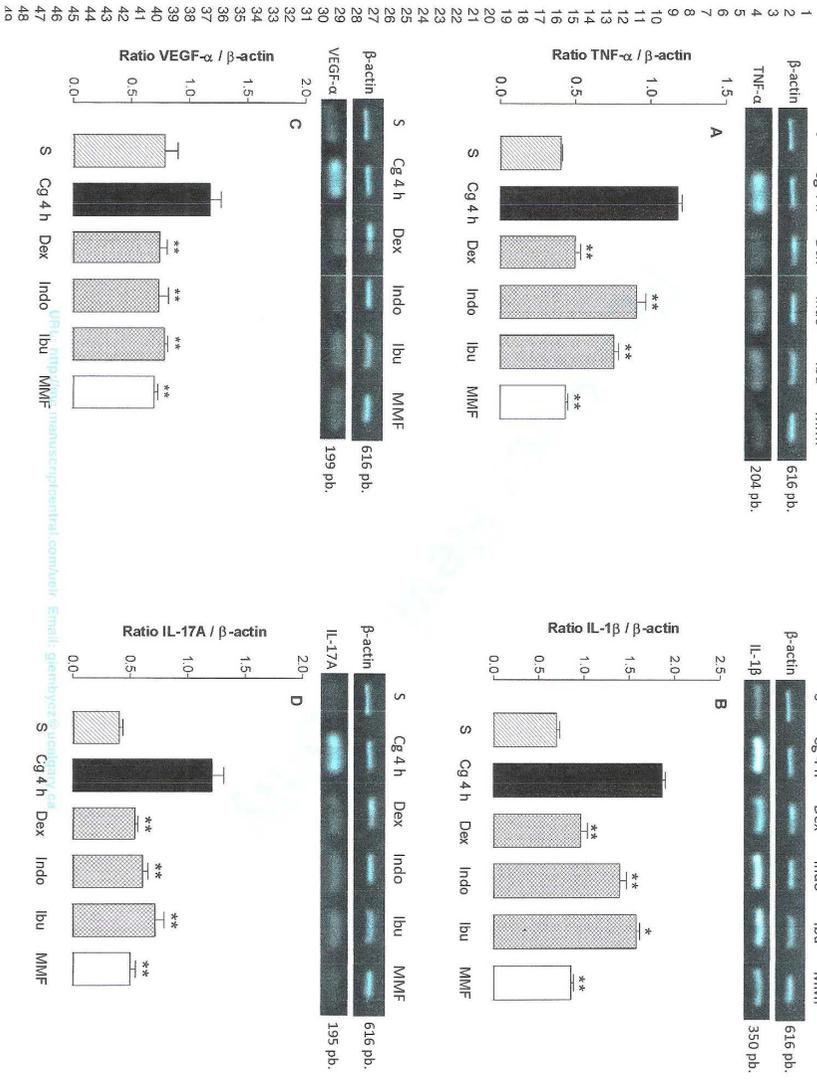
S: Animals treated only with sterile saline (NaCl 0.95%, negative control group); Cg: Animals treated with only carrageenan (1 %, positive control group); MMF: Animals pretreated with mycophenolate mofetil (100 mg/kg); Dex: Animals pretreated with Dexamethasone (0.5 mg/kg); Indo: Animals pretreated with Indomethacin (5 mg/kg); Ibu: Animals pretreated with Ibuprofen (30 mg/kg). a = administered by intrapleural route; b = administered by oral route; c = administered by intraperitoneal route. (*P < 0.05 and **P < 0.01). N = 5 animals.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

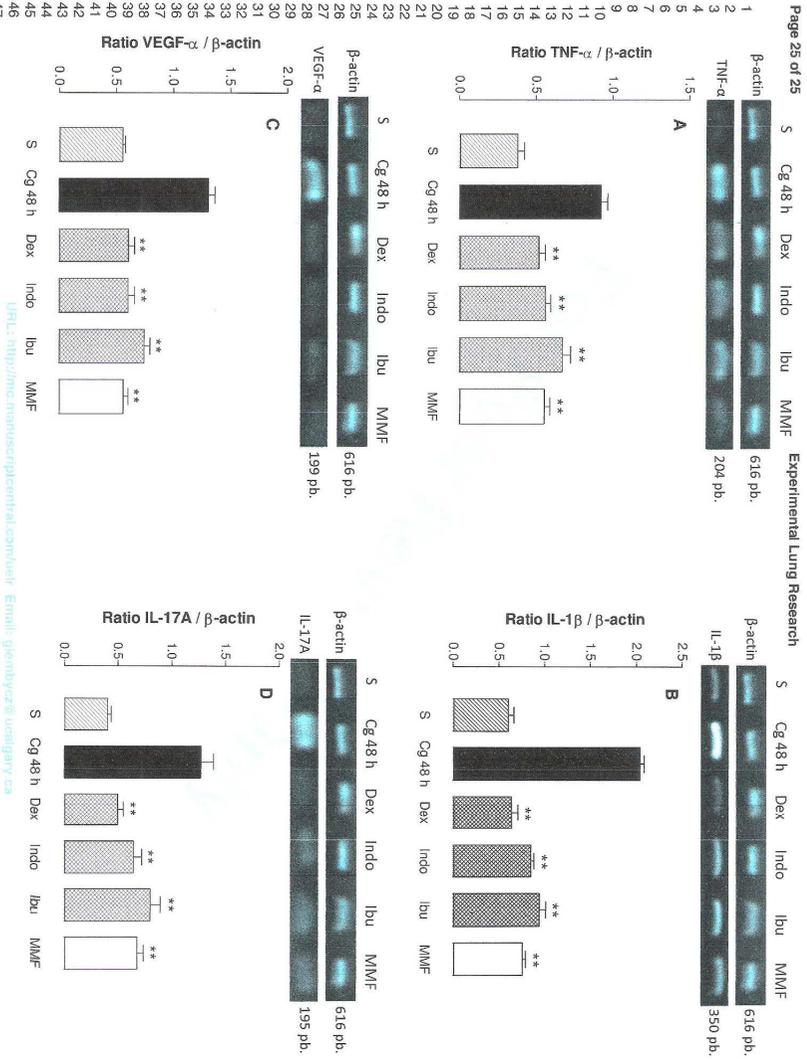




1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/201706>; this version posted June 20, 2017. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

manuscript central.com/iefr Email: gremlycz@uchicago.edu



URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/lelr> Email: glemblycz@uicgary.ca