

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA E
FARMACOLOGIA**

**Efeito de inibidores de ciclooxigenases sobre a
migração de leucócitos induzida em diferentes
modelos experimentais *in vivo* e *in vitro***

GUSTAVO BATISTA DE MENEZES

ORIENTADORA: Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi

BELO HORIZONTE – FEVEREIRO/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO BATISTA DE MENEZES

Efeito de inibidores de ciclooxigenases sobre a migração de leucócitos induzida em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi

BELO HORIZONTE – FEVEREIRO/2008

Dedicatória

***À minha Mãe**, a quem por toda minha vida dedicarei minhas conquistas, minha maior referência de vida. Dedico a você, mamãe, tudo o que sou.*

***Ao meu irmão Gui**, meu amigo incondicional, meu melhor vocalista e meu companheiro por toda vida;*

***Ao meu Pai**, por ter tanto orgulho de mim e me fazer acreditar que eu conseguiria ser melhor um dia.*

Agradecimentos:

À professora Janetti Francischi,

Acreditar em um aluno de 18 anos no segundo período de graduação, orientá-lo na iniciação científica, no mestrado e ainda no doutorado, não é uma tarefa fácil. Você, por todos esses oito anos, foi minha orientadora, minha amiga, minha mãe. Obrigado por ter me corrigido todas as vezes que foram necessárias e especialmente por dar-me oportunidade de ser eu mesmo.

Agradecimentos

Aos meus grandes amigos **Cláudio Heitor Balthazar**, que só mesmo sendo “três pessoas” para ser um amigo tão presente e **Rafael Rezende**, meu ídolo como farmacologista e baterista;

Ao meu grande amigo e mestre **Carlos Bettoni**, por desde sempre acreditar em mim;

À **Ediângela**, minha grande companheira, pelo amor e admiração.

À **Celinha**, nossa companheira, pela disponibilidade em resolver nossos problemas (e que não foram poucos...);

Às pessoas que “por trás do palco” possibilitaram a realização desse trabalho:

Jorge, Rinaldo, Lú, Rosa (parasitologia – ICB/UFMG) e Giu Bertozzi (FMRP – USP);

Ao **Webster**, pela disponibilidade em auxiliar-me nos experimentos;

Aos colegas de Laboratório de Inflamação e Dor – **Pedro, Kátia (DC), Júlia, Dorothea, Átila, Cíntia, Baretta, Marcos, Leani, Celso e Lucas** pela amizade e pelos ensinamentos;

Aos colegas de outros laboratórios, porém sempre próximos: **Flávio, Andrey, Michel Victor, Simonton, Ary, Ricardo, Cristiane e Sandrinha** - Vocês me fizeram muito bem!

Ao meu amigo **Warley** por “quebrar os galhos” enquanto eu desenvolvia esse trabalho, sempre me apoiando;

À professora **Dra. Denise Carmona e todas as alunas (os) do NIPE**, por ceder o espaço do seu laboratório e me ajudar bastante para que uma importante parte desse trabalho fosse realizada;

Aos professores **Alfredo Goes, Dalton Luiz e Ricardo Wagner** por cederem reagentes e instrumentais;

Aos professores que gentilmente aceitaram fazer parte dessa banca de doutorado:

Profa. Dra. **Catarina de Fátima Pereira Teixeira**, Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, SP.

Profa. Dra. **Sandra Helena Poliselli Farsky**, Fac. De Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. **André Klein**, Depto de Farmacologia, ICB/UFMG.

Profa. Dra. **Juliana Carvalho Tavares**, Depto de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG.

À minha família, por acreditar em mim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ILUSTRAÇÕES - 7

LISTA DE ABREVIATURAS - 10

RESUMO - 13

SUMMARY - 14

1- INTRODUÇÃO - 15

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS - 30

3- MATERIAL E MÉTODOS - 34

4- RESULTADOS - 44

5- DISCUSSÃO - 82

6- CONCLUSÕES - 91

7- REFERÊNCIAS - 92

8- ANEXOS - 111

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Esquema detalhado sobre os diferentes passos da cascata de adesão entre leucócitos e células endoteliais e as principais moléculas de adesão envolvidas. - 20

Ilustração 2 - Esquema representando os mecanismos moleculares e celulares na resposta inflamatória resolutive (A) e crônica (B). - 26

Figura 1 – Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos injetados com diferentes doses de endotoxina bacteriana (LPS, *E. coli*). - 46

Figura 2 – Contagem específica dos leucócitos presentes no lavado peritoneal de ratos injetados com LPS. - 47

Figura 3 – Relação entre o aumento do número total de leucócitos e de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos injetados com diferentes doses de endotoxina bacteriana. - 48

Figura 4 – Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos injetados com LPS após diferentes tempos. - 49

Figura 5 – Efeito dos inibidores não-seletivos de ciclooxigenases indometacina (indo) e piroxicam (piro) no recrutamento celular induzido por LPS. - 51

Figura 6 – Falta de efeito do SC560 sobre o recrutamento de leucócitos induzido por LPS na 6^a hora. - 53

Figura 7 – Estudo do efeito do celecoxibe sobre o recrutamento celular induzido por LPS em ratos – Curva dose-resposta. - 55

Figura 8 – Contagem específica dos leucócitos presentes no lavado peritoneal de ratos pré-tratados com celecoxibe. - 56

Figura 9 – Estudo do efeito do rofecoxibe e do SC236 sobre o recrutamento celular induzido por LPS em ratos. - 58

Figura 10 – Estudo do efeito da injeção intraperitoneal de prostaglandina $F_{2\alpha}$ na cavidade peritoneal de ratos na 3^a hora. - 61

Figura 11 – Estudo do efeito da injeção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ na cavidade peritoneal de ratos na 3^a hora – Participação dos neutrófilos. - 62

Figura 12 - Estudo do efeito da reposição de prostaglandina $F_{2\alpha}$ em animais pré-tratados com rofecoxibe e injetados intraperitonealmente com LPS. - 64

Figura 13 – Curva tempo-resposta da dosagem dos níveis de $PGF_{2\alpha}$ no lavado peritoneal de animais tratados com LPS. - 67

Figura 14 – Relação cronológica entre número de leucócitos e níveis de $PGF_{2\alpha}$ após injeção intraperitoneal de LPS. - 68

Tabela 1 – Dosagem dos níveis de $PGF_{2\alpha}$ no lavado peritoneal de animais pré-tratados com inibidores de ciclooxigenases e injetados com LPS. - 69

Figura 15 – Figura 15 – Efeito do tratamento dos animais com celecoxibe previamente à punção cardíaca para coleta de sangue na migração de neutrófilos na câmara de Boyden - 72

Figura 16 – Demonstração do efeito quimiotático do fMLP no modelo da câmara de Boyden – Efeito da incubação dos neutrófilos com doses crescentes de celecoxibe. - 73

Figura 17 – Efeito do celecoxibe sobre a migração celular induzida por LPS administrado intraperitonealmente em camundongos. - 77

Figura 18 – Efeito dos inibidores de COX nas diferentes fases do recrutamento leucocitário para o músculo cremáster de camundongos. - 78

Figura 19 – Efeito do SC 560 nas diferentes fases do recrutamento leucocitário para o músculo cremáster de camundongos. - 79

Tabela 2 - Parâmetros hemodinâmicos dos animais submetidos à microscopia intravital. - 80

Prancha 1 – Cortes histológicos do músculo cremáster corados por H&E (esquerda) e captura de *frame* das imagens da microscopia intravital (direita). -

81

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetil-salicílico
ANOVA	Análise de variância
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética Experimental Animal
Cg	Carragenina
COX	Ciclooxigenase
Coxibe	Inibidor de ciclooxigenase-2
e.p.m	Erro padrão da média
fMLP	formil-methyl-leucil-phenil
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICOX	Inibidor de ciclooxigenase
IL	Interleucina
ip	intraperitoneal
ie	intraescrotal
Kg	quilograma
LPS	lipopolissacarídeo
PBS	Salina tamponada por fosfatos / <i>Phosphate buffered saline</i>
PG	Prostaglandina
RNA	Ácido ribonucléico / <i>Ribonucleic acid</i>
sc	Subcutâneo (a)
SFE	Salina fisiológica estéril
TNF	Fator de Necrose Tumoral / <i>Tumoral necrosis factor</i>
TX	Tromboxano
µL	microlitro

RESUMO

Preliminarmente, demonstramos que o pré-tratamento dos animais com inibidores seletivos de COX-2 ou indometacina inibe o recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal induzido por LPS. Ainda, dentre as prostaglandinas envolvidas em tal efeito, $\text{PGF}_{2\alpha}$ parece ser um importante mediador para o recrutamento de leucócitos, pois a injeção desse prostanóide na cavidade peritoneal é capaz de induzir acúmulo de neutrófilos. Reforçando esses dados, a reposição de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em animais pré-tratados com inibidores seletivos de COX-2 restabeleceu a migração leucocitária outrora inibida. Com base nessas observações, nós investigamos o efeito dos inibidores de COX-2 em um modelo clássico de quimiotaxia (câmara de Boyden). Nós observamos que o celecoxibe e a indometacina, sob diferentes condições, inibem a quimiotaxia induzida por fMLP, o que não é observado quando se utiliza um inibidor seletivo de COX-1 (SC 560). Esses dados nos levaram a estudar em quais eventos do processo de migração de leucócitos essas drogas estariam interferindo. Para isso, usamos a preparação do músculo cremáster para visualização das fases utilizando microscopia intravital. O pré-tratamento dos animais com celecoxibe inibe o recrutamento de leucócitos induzido por LPS para a cavidade escrotal, provavelmente devido à redução do rolamento e da adesão dessas células com o endotélio. A indometacina também inibiu o recrutamento de leucócitos, mas não teve efeito sobre o número de células em rolamento. O pré-tratamento com o SC560 não teve nenhum efeito sobre o recrutamento de leucócitos, mas, interessante, o número de células em rolamento encontrou-se aumentado mesmo em animais que não receberam o estímulo inflamatório com LPS. Esses dados sugerem que a COX-1 possa exercer um papel regulatório sobre o rolamento de leucócitos, e que a COX-2 é de fato importante para o recrutamento de leucócitos nos modelos de inflamação estudados nesse trabalho.

SUMMARY

Previous studies have shown that pretreatment with a specific COX-2 inhibitor and indomethacin can inhibit LPS-induced leukocyte migration to the peritoneal cavity. Indeed, among the prostaglandins involved in such an effect, $\text{PGF}_{2\alpha}$ seems to be an important mediator for leukocyte recruitment since an injection of this prostanoid was capable of inducing neutrophil accumulation and its reposition in animals pretreated with a selective COX-2 inhibitor challenged with LPS was capable of restoring leukocyte migration inhibited by the coxib. In this paradigm, the effect of COX-inhibitors in a classic chemotactic assay (Boyden chamber) was investigated. Observation showed that celecoxib and indomethacin can inhibit chemotaxis induced by fMLP, but not the selective COX-1 inhibitor SC560. These data stimulated our group to investigate which leukocyte migration event these drugs were interfering in. For this, a cremaster preparation was used to access the microvasculature. Celecoxib can inhibit leukocyte migration to the cremaster muscle in animals that were injected with LPS in the scrotal cavity, probably due to reduced rolling and adhesion of these cells. Indomethacin also inhibited leukocyte migration, but it showed no effect on leukocyte rolling. Pretreatment with SC 560 presented no effect on leukocyte migration nor on adhesion, but it did enhance rolling activity in animals that were challenged or unchallenged by LPS in the scrotal cavity. This suggests that COX-1 has a regulatory role in this model, driving a physiological anti-rolling activity, since its inhibition by SC560, in the presence or absence of LPS, induced leukocyte rolling. Indeed, COX-2 seems to be an important enzyme in leukocyte migration in all the models studied in this work.

1- INTRODUÇÃO

Inflamação e terapêutica antiinflamatória

Inflamação é definida como a resposta dos tecidos vascularizados a um estímulo flogístico de qualquer etiologia. A capacidade desses tecidos de organizar uma resposta inflamatória diante de lesões foi uma importante aquisição evolutiva, uma vez que o processo inflamatório visa ao restabelecimento da homeostase (MÜLLER, 2002). Uma seqüência de eventos coordenados deflagra os sinais e sintomas da inflamação, descritos por Celsus em I d.C: tumor, rubor, calor e dor, sendo que a reunião desses fatores pode culminar na perda da função do órgão afetado. Esses sinais e sintomas inflamatórios decorrem de alterações microscópicas, que ocorrem principalmente na microcirculação: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sensibilização de terminações nervosas livres (FERREIRA *et al*, 1973) e migração leucocitária para o foco inflamatório (YAMANE *et al*, 2000).

Os eventos que resultam na instalação do processo inflamatório são derivados da produção e liberação de substâncias com estruturas químicas e origens diversas, denominadas mediadores inflamatórios. Esses mediadores podem ser derivados de peptídeos como CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), SP (substância P), bradicinina, citocinas, histamina ou ainda derivados dos fosfolipídios de membrana (prostanóides), dentre outros (HLA & NEILSON, 1992).

Em contrapartida, os mediadores inflamatórios podem exercer funções diferentes daquelas anteriormente atribuídas a eles. Substâncias como a prostaglandina E₂, que medeia eventos vasodilatadores e hiperalgésicos em processos inflamatórios, podem em determinadas condições exercer efeitos imunossupressores. Sendo assim, o grupo dos mediadores inflamatórios pode inclusive ser denominado como modulador de resposta inflamatória (WILLOUGHBY *et al*, 2000).

Várias doenças de caráter doloroso e destrutivo são acompanhadas de reações inflamatórias exacerbadas, como asma, glomerulonefrite, fibrose pulmonar, dentre várias outras (MÜLLER, 2002). Uma vez que a inflamação se torna o fator preponderante na etiologia da moléstia que acomete o indivíduo, a intervenção farmacológica com base em drogas antiinflamatórias é, na grande maioria das vezes, a terapêutica de primeira escolha.

Os antiinflamatórios não-esteroidais estão entre as drogas mais prescritas na atualidade. O princípio de ação desses compostos se baseia na inibição das enzimas ciclooxigenases (COX), que catalisam a formação de mediadores inflamatórios lipídicos (prostanóides) envolvidos na deflagração de grande parte dos sinais e sintomas da inflamação (VANE, 1971). Os prostanóides (prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos) são produtos do metabolismo do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico ou ácido araquidônico, um componente dos fosfolípidos da membrana celular. A conversão desse ácido em mediadores lipídicos é realizada pelas COX-1 e COX-2, também denominadas *Prostaglandin Endoperoxide Synthase* (PGHS, VANE e BOTTING, 2003). As prostaglandinas,

principalmente PGE₂ e prostaciclina (PGI₂), são importantes mediadores da inflamação, da dor e da febre (VANE *et al*, 1998). Os fatores de crescimento, citocinas e promotores tumorais amplificam a resposta inflamatória induzindo a expressão de ciclooxigenases, culminando na síntese em larga escala de prostaglandinas (HLA & NEILSON, 1992). Sendo assim, os antiinflamatórios são descritos como potentes agentes analgésicos, antitérmicos e antiinflamatórios (CHAN *et al*, 1999; HAWKEY *et al*, 1999).

Em 1999, uma nova classe desses medicamentos foi introduzida no mercado brasileiro: os inibidores seletivos de COX-2 (ICOX-2 seletivos ou *coxibes*). Celecoxibe (Celebra®, Pfizer), rofecoxibe (Vioxx®, MSD), etoricoxibe (Arcoxia®, MSD), dentre outros, são exemplos de formulações comerciais que obtiveram grande sucesso de venda desde a sua integração ao mercado farmacêutico mundial. A síntese desses compostos se baseou em estudos que demonstraram que a COX-1, uma das isoformas de ciclooxigenases, é constitutivamente expressa na maioria das células e catalisa a síntese de prostaglandinas envolvidas na manutenção fisiológica do organismo. Já a segunda isoforma (COX-2), que é também constitutiva em alguns órgãos, é principalmente expressa durante o processo inflamatório. Ainda, o RNA mensageiro de uma terceira isoforma (COX-3) já foi identificado em coração de humanos e córtex cerebrais de cães e humanos (CHANDRASEKHARAN *et al*, 2002), embora a funcionalidade biológica dessa isoforma ainda não tenha sido estabelecida. Sendo assim, inibidores seletivos de COX-2 seriam de grande utilidade na terapêutica antiinflamatória, já que a rigor apresentariam efeitos

colaterais reduzidos por agirem seletivamente sobre a enzima-chave da síntese em larga escala de mediadores inflamatórios lipídicos, tendo pouco efeito sobre a manutenção das funções fisiológicas promovidas pela COX-1 (SMITH *et al*, 1998).

Estudos concomitantes com o lançamento dos inibidores de COX-2 no mercado já relatavam que a elevada seletividade de inibição da COX-2 apresentada por essas drogas poderia ter importantes efeitos colaterais, principalmente no sistema cardiovascular (MITCHELL & EVANS, 1998). Drogas do tipo da aspirina inibem a formação de tromboxano A_2 (TXA₂), um agente que causa agregação plaquetária produzido principalmente por plaquetas através da ação da COX-1. Essas drogas inibem também a formação de prostaciclina (PGI₂), principal prostanóide produzido pelo endotélio vascular a partir da indução da COX-2 nessas células em situações de stress de cisalhamento aumentado, que têm efeito inibitório sobre a agregação plaquetária, além de ser um potente vasodilatador (VANE & BOTTING, 2003). Aparentemente, há uma relação de equilíbrio fisiológico na produção desses dois mediadores com relação à manutenção do tônus vascular e nos processos de coagulação sanguínea. Os inibidores seletivos de COX-2, em contrapartida, não afetam a produção de TXA₂ por plaquetas, já que essas não expressam COX-2. Assim, é esperado que a ação trombogênica e vasoconstritora do TXA₂ se sobreponha aos efeitos antagônicos da PGI₂, podendo levar a um aumento do risco de ocorrência de trombose vascular e infarto do miocárdio em pacientes usuários de coxibes (FITZGERALD, 2004).

Foram publicados em 2004 os resultados de um estudo clínico prospectivo, randomizado e controlado com placebo, com duração prevista de três anos, denominado estudo APPROVe (*Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX - Prevenção de Pólipos Adenomatosos com Vioxx*).

O APPROVe foi um estudo multicêntrico que incluiu 2.600 pacientes e foi iniciado no ano 2000. Esse estudo, que foi interrompido, foi projetado para avaliar a eficácia de 25mg de rofecoxibe (Vioxx®, MSD) na prevenção da recorrência de pólipos em pacientes com histórico de adenomas colorretais. Nesse estudo foi constatado um risco relativamente maior de eventos cardiovasculares confirmados (3,5% no grupo Vioxx® e 1,9% no grupo placebo; TOPOL, 2004), tais como isquemia cardíaca e acidentes vasculares cerebrais, que ocorreram a partir de 18 meses após o início do tratamento em pacientes que receberam rofecoxibe, em comparação com aqueles que receberam placebo. Os resultados referentes aos primeiros 18 meses do estudo APPROVe não indicaram maior risco de eventos cardiovasculares. Isto é, o uso constante por até um ano e meio de rofecoxibe parece não aumentar a chance de ocorrência de eventos cardiovasculares, porém a partir de 18 meses o risco é significativamente maior.

Tais resultados resultaram, no dia 30 de setembro de 2004, na retirada voluntária do Vioxx® do mercado farmacêutico por seu fabricante, a indústria farmacêutica Merck, Sharp & Dohme. Esse fato gerou manifestações da comunidade científica, já que o rofecoxibe foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) antes de estudos completos serem realizados com esse

medicamento, levando a uma publicação que acusaria o órgão de saúde pública americano de falha no processo de aprovação de medicamentos (FITZGERALD, 2004).

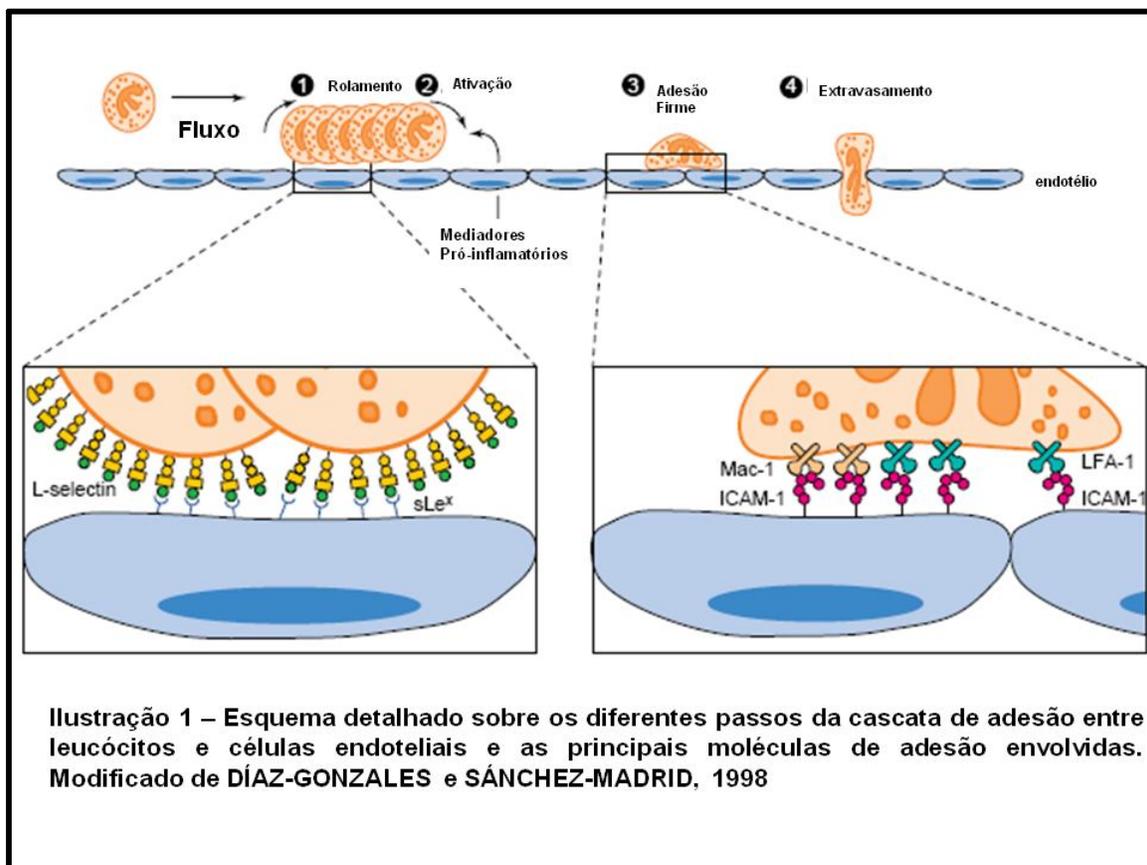
Antes de ser retirado do mercado farmacêutico, mais de 80 milhões de pessoas já haviam consumido o Vioxx® e as vendas anuais já haviam atingido a casa dos 2,5 bilhões de dólares (dados da Acessoria de Imprensa *on line* da MSD, 30/09/04).

Assim, a ampliação dos estudos científicos envolvendo os inibidores de COX-2, além daqueles publicados pelas próprias empresas que os desenvolveram, é desejável e de extrema importância para uma utilização mais segura desses compostos na terapêutica.

Recrutamento de leucócitos

O recrutamento leucocitário para o local inflamado é um passo importante para o início e amplificação do processo inflamatório (WEDMORE & WILLIAMS, 1981). O acúmulo de leucócitos nos tecidos inflamados ocorre como uma consequência da ativação de células endoteliais e migração de leucócitos para o foco inflamatório. Na primeira parte da resposta inflamatória ocorre um predomínio da infiltração de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e seqüencialmente, de acordo com o caráter do processo, pode haver uma sucessão para um perfil mononuclear (macrófagos e linfócitos).

O processo de extravasamento leucocitário requer uma cascata de eventos, que envolvem a adesão entre os leucócitos e as células endoteliais, podendo ser divididos em quatro passos, como mostra esquematicamente a Ilustração 1.



A liberação de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, aminas vasoativas, prostaglandinas) como consequência da lesão tecidual induz uma rápida e dramática mudança nas propriedades adesivas da célula endotelial. Imediatamente após essas mudanças ocorrerem, os leucócitos aderem e iniciam o rolamento pela parede vascular. Esta interação inicial leucócito-endotélio é

principalmente mediada por selectinas, que são glicoproteínas transmembrana do tipo 1 dependentes de cálcio. Existem três tipos de selectinas, incluindo L-selectina, E-selectina e P-selectina, nomeadas de acordo com os tipos celulares nos quais elas foram originalmente identificadas (leucócitos, endotélio e plaquetas, respectivamente). A P-selectina (CD62P) é constitutivamente expressa e estocada nos grânulos de secreção conhecidos como grânulos- α (em plaquetas) ou nos corpos de Weibel-Palade (no endotélio). Quando o endotélio é estimulado por mediadores inflamatórios como trombina, cisteinil-leucotrienos, agentes oxidantes, histamina ou LPS (lipopolissacarídeo), os corpos de Weibel-Palade rapidamente (em minutos) se fundem com a membrana plasmática, aumentando a expressão de P-selectina (KELLY *et al*, 2007). Já E-selectina (CD62E) é sintetizada *de novo* e expressa no endotélio a partir da estimulação por mediadores como IL-1, LPS e TNF- α em aproximadamente duas horas após o estímulo e decai com 24 horas. A expressão dessa selectina diminui drasticamente a velocidade de rolamento aumentando assim a probabilidade de adesão. Já a L-selectina (CD62L) é a única que medeia recrutamento de linfócitos em vênulas maiores de tecidos linfáticos, sendo que em condições inflamatórias ela parece exercer um papel secundário às demais selectinas (KELLY *et al*, 2007).

Posteriormente ao início do rolamento, a força de adesão é aumentada por expressão de moléculas de adesão, sendo as de maior relevância as β -2 integrinas, representadas pela LFA-1 (*leukocyte function-associated molecule* – $\alpha_L\beta_2$), MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$), dentre outras. Os membros da superfamília das

imunoglobulinas expressas pelo endotélio servem como ligantes para as integrinas dos leucócitos. ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) e ICAM-2 são ligantes endoteliais para LFA-1 e são constitutivamente expressas, sendo que citocinas podem aumentar essa expressão. VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), ao contrário, não é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, mas a sua síntese *de novo* é estimulada por TNF e IL-1 (KELLY *et al*, 2007). A expressão dessas moléculas de adesão é regulada principalmente por quimiocinas, proteínas de 8 a 15 kiloDaltons, que são reconhecidas por sua capacidade de recrutar vários tipos de leucócitos para o foco da inflamação. Existem aproximadamente 50 tipos de quimiocinas que podem se ligar seletivamente a 20 tipos de receptores, sendo que o envolvimento dessas citocinas na patogênese de várias doenças tem sido cada vez mais descrito (revisado por VIOLA & LUSTER, 2007). A maior fonte de quimiocinas são os leucócitos recém-migrados, macrófagos, mastócitos e várias células teciduais incluindo fibroblastos, células epidermais e endoteliais (DÍAZ-GONZALES e SÁNCHEZ-MADRID, 1998).

Além do rolamento e da adesão, recentemente um novo passo na cascata do recrutamento leucocitário, mediado principalmente por MAC-1, tem sido elucidado. Em vênulas pós-capilares de locais inflamados, imediatamente após a adesão, ocorre um fenômeno denominado *crawling* (“arrastar, engatinhar”) onde o leucócito busca a junção endotelial mais próxima para deixar a circulação. Este passo tem sido descrito como um passo fundamental para a migração (PHILIPSON *et al*, 2006).

A diapedese e a subsequente migração de leucócitos para os tecidos intersticiais são estimuladas por um gradiente de agentes quimiotáticos solúveis ou de superfície celular oriundos do sítio inflamado, incluindo-se ainda produtos bacterianos (LPS, endotoxinas), fatores derivados de células necróticas e citocinas produzidas por células residentes em resposta ao estímulo inflamatório (MÜLLER, 2002). Numerosas proteínas, incluindo CD31 (PECAM), CD99, caderinas vascular-endotelial estão envolvidas nesse processo. Estudos com microscopia eletrônica têm reportado que os leucócitos deixam os vasos em direção ao espaço extravascular através das junções intercelulares, porém o mesmo método tem revelado que a migração transcelular pode também ocorrer (KELLY *et al*, 2007). Atingindo o foco inflamatório, os leucócitos tornam-se ativados e podem exercer funções de defesa do hospedeiro e reparo tecidual ou, se continuamente recrutados, podem intensificar a lesão (FURIE & GWENDALYN, 1995).

Resolução do processo inflamatório

A resolução de um processo tão bem orquestrado como a inflamação é essencial para o retorno à homeostase, que é, como dito anteriormente, o objetivo principal desse fenômeno. A idéia de que a resposta inflamatória gera seus próprios mediadores reguladores faz sentido teleologicamente: é mais fácil regular um processo que possui variáveis positivas e negativas ao mesmo tempo. Ou pelo menos, um nível mais fino de controle pode ser alcançado

quando se produzem mediadores que não só possuem características pró-inflamatórias, mas também antiinflamatórias.

Após a indução e o estabelecimento do processo inflamatório, a velocidade de dissipação dos agentes quimiotáticos ou dos sinais iniciais da inflamação depende da magnitude do agente infeccioso ou da lesão. Neutrófilos em pequeno número no tecido caracterizam histologicamente a fase de resolução da inflamação. Concomitantemente, células mononucleares exercem um papel fundamental no reparo tecidual (ARIEL *et al*, 2007). Um resumo dos caminhos que o processo inflamatório pode seguir está representado na ilustração 2.

Uma das primeiras indicações de que o processo inflamatório parece assumir um caráter resolutivo foi a demonstração de que uma mesma enzima, em diferentes estágios da inflamação, pode produzir mediadores com efeitos biológicos opostos. Em processos inflamatórios, como na pleurisia induzida por carragenina, a expressão de COX-2 atinge um pico inicial na segunda hora, que está associado com a elevada síntese de PGE₂. Entretanto, há um segundo pico de expressão dessa enzima após 48 horas, que coincide, de maneira paradoxal, com os estágios de resolução da inflamação aguda e com uma síntese mínima de PGE₂. Porém, nesse instante, os níveis de PGD₂ e 15-deoxi-PGJ₂ são muito superiores aos encontrados no início do processo. Sabendo que esse grupo de prostaglandinas possui efeitos antiinflamatórios, postulou-se que há uma divisão temporal no que se refere aos mediadores sintetizados no sítio inflamatório. Ainda, essa regulação parece ser principalmente exercida pelo tipo celular

dominante no estágio avaliado, uma vez que a produção desses mediadores varia de acordo com o tipo de célula presente e da maquinaria bioquímica disponível (GILROY *et al*, 1999).

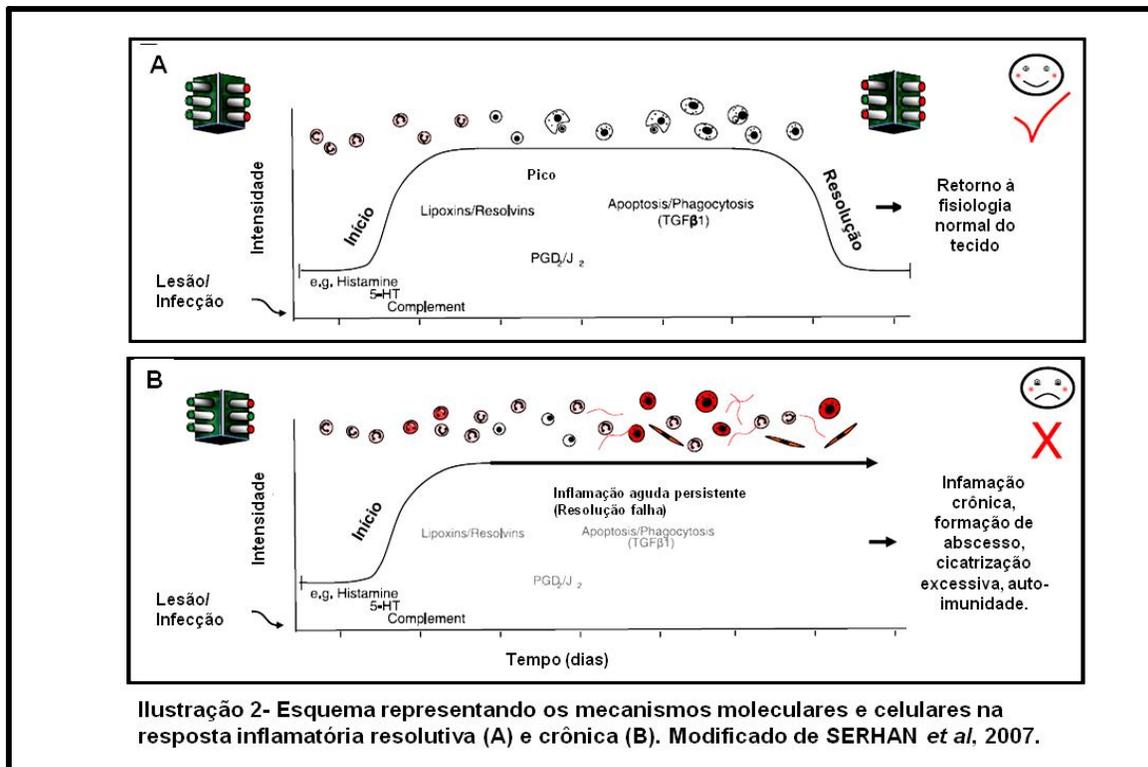
As lipoxinas foram os primeiros mediadores a serem reconhecidos por possuírem atividades pró-resolutivas, limitando o recrutamento de neutrófilos somente aos locais inflamados e ainda estimulando o retorno da permeabilidade vascular ao normal, culminando em um efeito anti-edematogênico (SERHAN, 2007). De maneira interessante, a síntese de lipoxinas pode ser estimulada pelo ácido acetilsalicílico (AAS), gerando as ATLS (*Aspirin Triggered Lipoxins*). De maneira geral, a COX-2 acetilada pelo AAs não é capaz de produzir prostaglandinas, mas se mantém enzimaticamente ativa para produzir 15-*R*-HETE (ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico) a partir do ácido araquidônico e ser convertido a 15-*epi*-lipoxinas por leucócitos e assim exercer efeitos biológicos (TAKANO *et al*, 1997).

Recentemente, novas famílias de mediadores foram descobertas. Estes mediadores são biosintetizados a partir de ácidos graxos essenciais como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA). São mediadores endógenos, que foram caracterizados a partir de exsudados inflamatórios recolhidos na fase de resolução da inflamação. São denominados resolvinas e protectinas, já que os membros dessas famílias regulam a duração e a magnitude da resposta inflamatória (ARIEL *et al*, 2007).

As resolvinas da série E (derivadas do EPA) foram as primeiras identificadas. Resolvina E1, em concentrações nanomolares, reduz

dramaticamente a migração de neutrófilos e de células dendríticas, além de bloquear a produção de IL-12 *in vivo* e *in vitro*. Já as resolvinas da série D (derivadas do DHA) bloqueiam a liberação de TNF- α induzida por IL-1 β e são também potentes reguladoras da infiltração de neutrófilos. Ainda, derivadas do mesmo ácido graxo, as protectinas demonstram efeitos antiinflamatórios e neuroprotetores (SERHAN, 2007).

Sendo esses mediadores pró-resolutivos derivados de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, a identificação dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos benéficos das dietas ricas desses ácidos é um importante desafio para a nutrição e para a medicina. Ainda, o entendimento da regulação do processo inflamatório trará melhores perspectivas para a terapêutica, uma vez que a prescrição um medicamento tido como antiinflamatório, em estágios de resolução, pode agravar os sinais e sintomas da doença e retardar o processo de cura e cicatrização (GILROY *et al*, 1999).



Modelos para estudo do recrutamento de leucócitos

O estudo da migração de leucócitos para o foco inflamatório, além de fornecer informações importantes sobre a cinética celular, permite avaliar o perfil de ação de drogas antiinflamatórias. Os modelos experimentais utilizados para se estudar inflamação empregam metodologias que se baseiam em desencadear um processo inflamatório por um agente lesivo simples (agentes químicos, toxinas de microrganismos, venenos animais, partículas inertes, lesões estéreis) para que, posteriormente, a avaliação quantitativa e/ou qualitativa seja possível. Para isso, modelos envolvendo tecidos de fácil acesso são frequentemente utilizados: pulmão, bolhas de ar no dorso animal, patas e

cavidade peritoneal. A análise histopatológica é também muito empregada para se caracterizar o processo inflamatório (BRITO *et al*, 1998). Outros modelos, também já bem estabelecidos, utilizam fluidos obtidos de lavagem de cavidades corporais com soluções inertes, como a cavidade pleural (lavado broncoalveolar; FRANCISCHI *et al*, 1993) e a cavidade peritoneal (lavado peritoneal; LUKACS *et al*, 1995, YAMANE *et al*, 2000, SANTOS *et al*, 2004, MENEZES *et al*, 2005) para estudo do processo inflamatório.

O modelo de inflamação que utiliza cavidade peritoneal já é alvo de interesse de pesquisadores há vários anos. Esse modelo experimental possibilita o estudo da cinética de leucócitos (SPICER *et al*, 1985) e análise da concentração de mediadores inflamatórios presentes no lavado peritoneal (OLIVEIRA *et al*, 1996). É possível, através de contagens do número e do tipo de células presentes no lavado peritoneal, quantificar e caracterizar a resposta inflamatória induzida nesse modelo.

Diversas informações a respeito dos mecanismos envolvidos em respostas inflamatórias, como na hiperalgesia e no edema, são elucidadas pelo estudo das células inflamatórias ativadas por diferentes agentes, como a carragenina (agente flogogênico extraído de algas marinhas vermelhas) e o LPS (endotoxina bacteriana; AJUEBOR *et al*, 1999). O LPS é o principal constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativo e é o mais importante iniciador de respostas inflamatórias a patógenos, podendo levar a quadros de endotoxemia e, *in extremis*, a falência múltipla de órgãos (ALLCOCK *et al*, 2000).

No edema induzido por carragenina, os efeitos vasculares da fase aguda podem estar relacionados com a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) para o local inflamado (WEDMORE & WILLIAMS, 1981) e a contribuição dessas células para o efeito edematogênico é baseada nos trabalhos de Arthus, de 1903, no modelo de reação de hipersensibilidade do tipo III (ARTHUS, 1903, revisado por WEDMORE & WILLIAMS, 1981). Ainda, estudos têm demonstrado que o processo de migração de neutrófilos, uma vez descontrolado, pode ser extremamente deletério e culminar em lesões que em alguns casos são o fator predominante na patogenia de algumas doenças (ALLCOCK *et al*, 2000; DUILIO *et al*, 2001).

Ainda, a migração de leucócitos pode ser também estudada utilizando modelos de quimiotaxia *in vitro*. As câmaras plásticas de quimiotaxia ou câmara de Boyden constituem um modelo bem descrito para tais estudos (MENDONÇA *et al*, 2006, TAVARES-MURTA, 2002). É possível com este modelo estudar individualmente uma substância, uma vez que as células podem ser expostas a um único agente quimiotático. Dentre eles, fMLP (*N*-formil- *L*- methionil – *L*-leucil – *L* phenilalanina), LTB₄ (leucotrieno B₄), IL-8 (interleucina 8; MENDONÇA *et al*, 2006) e PGF_{2α} (ARNOULD *et al*, 2001) têm sido descritos como agentes quimiotáticos úteis para estudos em câmara de Boyden.

A visualização de todo processo de migração celular, fase a fase, é também possível quando se utiliza a microscopia intravital. Um leito vascular residente em um tecido pode ser visualizado com o auxílio de um microscópio comum (nos casos de tecidos translúcidos) ou de fluorescência (nos casos de

tecidos opacos) e as imagens podem ser capturadas por uma câmera de vídeo, gravadas e posteriormente analisadas. Os padrões hemodinâmicos do elemento vascular em questão também são passíveis de avaliação neste modelo de estudo (KUBES *et al*, 2003, CARA *et al*, 2004, LIU *et al*, 2007).

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A aspirina, protótipo das drogas antiinflamatórias não esteroidais, entrou no mercado farmacêutico em 1898. Ela foi desenvolvida como uma alternativa menos tóxica ao salicilato, que já era utilizado por Hipócrates no século V a.C. para o alívio da dor e da febre. Os efeitos colaterais derivados do seu uso foram rapidamente relatados e nas décadas subseqüentes ao seu lançamento vários trabalhos confirmaram que a aspirina era capaz de causar danos ao estômago, dispepsia, perdas sanguíneas associadas às úlceras gástricas, dentre outros efeitos colaterais menos freqüentes. Em parte devido a isso, inúmeras outras drogas antiinflamatórias foram inseridas no mercado. De maneira geral, essas novas drogas possuíam maior efeito analgésico e antiinflamatório do que a aspirina, mas ainda retinham a capacidade de induzir ulcerações e sangramentos no trato gastrointestinal. Até então, o mecanismo pelo qual essas drogas apresentavam tais efeitos colaterais não era conhecido. Em 1971, John Vane apresentou uma explicação para a patogenicidade desses medicamentos. Os trabalhos de Vane e colaboradores foram essenciais para o estabelecimento da importância dos mediadores inflamatórios lipídicos, em especial das prostaglandinas, como mediadores da inflamação e ainda como promotores de proteção de mucosas contra agressões. Esses dados inclusive guiaram a síntese de análogos desses prostanóides como alternativa terapêutica para os danos causados pelo tratamento com os antiinflamatórios não esteroidais.

Embora a sugestão da existência de múltiplas isoformas de ciclooxigenases já tivesse sido sugerida nesses trabalhos de Vane e colaboradores, foi somente em 1991 que dois grupos confirmaram a existência de duas isoformas distintas de COX (KUJUBU *et al*, 1991, XIE *et al*, 1991). Essa descoberta desencadeou um investimento enorme das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de inibidores seletivos de COX-2. A inserção desses medicamentos no mercado farmacêutico alcançou um enorme sucesso de vendas e concomitantes a isso vários estudos começaram a ser realizados por grupos de pesquisa em todo mundo.

O mecanismo de ação dos inibidores de ciclooxigenases ainda é bem discutido na literatura. Embora seus efeitos terapêuticos tenham sido inicialmente creditados somente à inibição dessas enzimas, grupos de pesquisa em diferentes lugares têm relacionado os mecanismos pelo quais essas drogas agem à liberação endógena de opióides (FRANÇA *et al*, 2006), de endocanabinóides (KOSAK *et al*, 2002) e ainda existem evidências de que essas drogas possam exercer suas ações em determinados modelos de estudo por um mecanismo independente da inibição de COX (KARDOSH *et al*, 2005, MYAMOTO *et al*, 2006).

Em estudos paralelos em nosso laboratório, os inibidores de COX-2 apresentaram um potente efeito analgésico no modelo de hiperalgisia inflamatória induzida pela carragenina na pata de ratos (FRANCISCHI *et al*, 2002). Ainda, demonstramos que o pré-tratamento dos animais com celecoxibe foi capaz de inibir o recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal de

ratos (MENEZES *et al*, 2003), para o tecido pulpar (MALTOS *et al*, 2004) e para o tecido gengival (QUEIROZ-JÚNIOR *et al*, 2008) de animais submetidos a diferentes estímulos pró-inflamatórios.

Desta forma, sabendo que neutrófilos contribuem para a lesão tecidual, pode ser benéfico prevenir sua acumulação no foco inflamatório. Glicocorticóides têm sido utilizados por muito tempo como agentes antiinflamatórios por reduzirem a migração de leucócitos em vários modelos de inflamação (TAILOR *et al*, 1997), porém essas drogas possuem um largo espectro de ação, o que pode acarretar também uma grande incidência de efeitos colaterais. Com o advento de novas alternativas terapêuticas antiinflamatórias, mais recentemente com a introdução dos inibidores de COX-2, os efeitos colaterais reduzidos dessas drogas associados à sua eficácia na utilização na clínica fazem desses medicamentos uma alternativa terapêutica interessante. Sendo assim, torna-se importante estudar a participação das ciclooxigenases em modelos de migração leucocitária que, em última análise, fornecerá informações relevantes acerca dos mecanismos de ação de tais drogas.

OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos dos inibidores de ciclooxygenases sobre a migração de leucócitos induzida *in vivo* e *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a- Comparar a atividade antiinflamatória dos inibidores de ciclooxygenases (tradicionais e seletivos para COX 1 ou 2) nesse modelo experimental;
- b- Verificar a cinética de liberação de prostaglandinas no modelo de migração de leucócitos induzido por LPS a partir da dosagem das concentrações desse mediador no lavado peritoneal por ensaio imunoenzimático (EIA);
- c- Estudar a atividade de prostaglandinas na migração celular induzida no peritônio de ratos;
- d- Verificar a correlação da inibição da migração celular pelos inibidores de COX com os níveis de prostaglandinas dosados;
- e- Estudar os efeitos dos inibidores de COX nas fases do recrutamento leucocitária induzida por LPS através da técnica de microscopia intravital.
- f- Estudar o efeito de inibidores de COX sobre a migração leucocitária *in vitro*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados neste estudo ratas Holtzman pesando entre 140-180g e camundongos Swiss machos, com idade de 5-6 semanas, pesando entre 25-40g, ambos cedidos pelo CEBIO-ICB/UFMG. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libidum* em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas desde o início dos experimentos. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) sob o protocolo nº 120/04.

Indução do recrutamento celular para a cavidade peritoneal dos animais

O modelo de migração celular para a cavidade peritoneal de ratos já é bem descrito na literatura (SCHULIGOI *et al*, 1998; AJUEBOR *et al*, 1998; YAMANE *et al*, 2000; KNAPP *et al*, 2003). Estudos anteriores demonstraram que macrófagos estimulados com LPS expressam COX-2, o que passou a se constituir em um ensaio padrão para expressão dessa isoforma (GROSSMAN *et al*, 1995).

Os estímulos pró-inflamatórios (descritos individualmente na seção de resultados) foram injetados no tempo zero intraperitonealmente (ip) diluídos em um volume total de 1 mL para ratas e 1mL/Kg para camundongos. Curvas dose-resposta foram obtidas e a dose de flogógeno que induziu o maior aumento no número de células em relação ao grupo controle foi escolhida como padrão. Na ocasião da troca do lote do LPS utilizado, uma nova curva dose-resposta foi

confeccionada, sendo novamente escolhida a menor dose que foi capaz de induzir aumento significativo no número de células na cavidade peritoneal. Animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina pela mesma via e animais que não foram submetidos a nenhum tratamento (naive) também foram estudados.

Drogas utilizadas: diluição e vias de administração

Nos estudos *in vivo*, os inibidores de ciclooxigenases e os respectivos veículos foram administrados por via subcutânea (sc) no dorso do animal, trinta minutos antes da injeção do agente flogógeno ou salina fisiológica estéril. As drogas foram diluídas seguindo orientações do fabricante e, quando necessário, as soluções foram submetidas à agitação em ultra-som para se obter uma melhor dissolução da droga. Celecoxibe, rofecoxibe e piroxicam foram diluídos em salina fisiológica estéril. A indometacina foi diluída em tampão Tris (0.1 M, pH=8,0, Sigma) e os compostos experimentais SC236 e SC560 foram diluídos na proporção 0.2/0.8/1.0 de Tween 85, etanol e salina, respectivamente. Os animais controle receberam os respectivos veículos das drogas antiinflamatórias nas mesmas condições (1mL/Kg, sc).

A endotoxina bacteriana (LPS; B4:111, Sigma) foi diluída em salina e o peptídeo quimiotático fMLP foi diluído inicialmente em DMSO (dimetilsulfóxido) e posteriormente em meio de cultura (RPMI, Sigma).

Todas as drogas foram diluídas em condições estéreis (capela de fluxo laminar).

Coleta dos leucócitos

Após diferentes tempos (0-24 h) da injeção de salina ou flogógenos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Foram injetados intraperitonealmente 10 mL de PBS heparinizado (*phosphate buffered saline*, 0.15M, pH=7.2-7.4; 5 U/mL de heparina) nos experimentos em que se utilizaram ratas e 3 mL nos que camundongos foram utilizados. O abdômen foi massageado aproximadamente 25 vezes e após a exposição do peritônio, através de um pequeno orifício, o lavado peritoneal foi recolhido (cerca de 90% do volume injetado) utilizando-se pipetas plásticas de Pasteur e acondicionado em tubos plásticos de centrífuga. O lavado foi centrifugado em baixa rotação (10 minutos, 200 x g) e o sobrenadante foi descartado. Os lavados peritoneais que apresentaram coloração avermelhada, indicando presença de sangue, foram descartados.

Contagem global e específica dos leucócitos

O sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de PBS para realização de contagens celulares posteriores sob microscopia de luz. O número de células totais presentes em alíquotas de 20µl adicionadas a 400µl de líquido de Turk foi estimado através de contagem em câmara de Neubauer (aumento de 400 vezes; células/mm³). O número específico de células foi estimado através de contagem de células presentes em alíquotas de 100µl adicionadas a 100µl de albumina bovina 3%. Duas alíquotas de 50µl foram depositadas nos poços de

citocentrífuga, onde havia lâminas de vidro cobertas com papel de filtro. Após centrifugação por 30 segundos a 1000 rpm, foi aguardada a secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa (WIND *et al*,1999) e contadas sob microscopia de luz (%) em objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes).

Dosagem dos níveis de PGF_{2α} por ELISA

O lavado peritoneal de ratos injetados com LPS, sob diferentes condições de tratamento, foi recolhido em 3 mL de PBS contendo heparina (5U/mL) e indometacina (2mg/L) e centrifugado (200 x g, 10 min.). O sobrenadante foi recolhido e acondicionado em tubos de vidro para dosagem (imediatamente após a coleta) por método imunoenzimático utilizando-se kits (EIA-kit, Caymann Chemical Co – USA) seguindo as orientações do fabricante.

Os resultados das leituras das placas no espectrofotômetro foram analisados por uma planilha de software (Microsoft Excel) fornecida pelo *website* da empresa fabricante em que, a partir dos valores de absorbância obtidos em triplicata, obtinha-se a concentração do mediador na amostra analisada.

Purificação de polimorfonucleares de sangue de ratos

Com o objetivo de se estudar individualmente o efeito de uma droga antiinflamatória ou de um agente com capacidade quimiotática para neutrófilos, utilizou-se um modelo de migração leucocitária *in vitro* que se constitui de uma câmara plástica (*Neuroprobe® 48-well microchemotaxis chamber*, ou câmara de

Boyden modificada) onde neutrófilos purificados a partir de sangue periférico são expostos a um agente quimiotático e atravessam os poros de um filtro.

Os neutrófilos foram obtidos de animais (anestesiados com uma mistura de 200mg/Kg de ketamina e 10mg/Kg de xilasina) submetidos a uma punção cardíaca. Foram retirados 5 mL de sangue de cada animal. Em seguida, o sangue foi depositado cuidadosamente sobre 5 mL de Histopaque® (densidade 1,077g/mL, Sigma) em tubos de vidro estéreis (Vacutainer®) e centrifugado a 400 x g por 40 minutos. Posteriormente, o sobrenadante (Histopaque, plasma e células mononucleares) foi aspirado com pipetas de vidro e descartado. O sedimento de hemácias e polimorfonucleares foi adicionado a 2 mL de uma solução de dextrana (6%; 500 Kda) e um volume final de 7 mL foi acertado com PBS (ULBRICH *et al*, 2005; MENDONÇA *et al*, 2006). Esse material foi incubado por 90 minutos a 37° C em tubos inclinados e o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 200 x g por 10 minutos. O sobrenadante deste procedimento foi novamente descartado e o sedimento foi ressuspenso com 5 mL de uma solução para lise de hemácias (NH₄Cl 9%; KHCO₃ 1% e EDTA 0,37%). Após 10 minutos de centrifugação a 200 x g, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado duas vezes com 10 mL de meio de cultura (RPMI). O sedimento celular final foi diluído inicialmente com 1 mL de meio de cultura para contagem do número de células em câmara de Neubauer e uma alíquota (50µl) foi separada para coloração para contagem específica e verificação da viabilidade celular pelo método de exclusão de eosina Y (viabilidade mínima de 90%). Após

a contagem do número de neutrófilos, as diluições (com RPMI) para se obter a concentração desejada de células foram realizadas.

Ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden

A partir dos neutrófilos purificados, o ensaio de migração foi iniciado. O peptídeo quimiotático fMLP foi escolhido como padrão para esses estudos (MENDONÇA *et al*, 2006). Na parte inferior da câmara foram colocadas alíquotas de 28,5µl desse peptídeo ou de seu solvente (RPMI; grupo controle) e essas foram cobertas por um filtro de policarbonato com poros de 5µm. Um reforço de silicone foi acondicionado e a câmara fechada com a porção superior. Nos poços dessa porção, 50µl da solução de neutrófilos (com diferentes concentrações e tratamentos, descritos na seção resultados) foram depositados e a câmara com as células foi incubada por 60 minutos em estufa (37° C, 5% CO₂). Após a incubação, o filtro foi retirado e a face voltada para cima foi raspada três vezes com uma lâmina metálica para se retirarem células que se depositaram por gravidade e o filtro foi corado pelo método rápido (Panótico Rápido, Biolab, Brasil). A face inferior do filtro, para a qual os neutrófilos migraram, foi contada sob microscopia de luz (imersão em óleo, aumento de 1000x). Foram contados cinco campos por poço, aleatoriamente escolhidos, e a média desses poços foi obtida para posteriores comparações. Os resultados foram expressos em células/campo.

Preparação do músculo cremáster de camundongos para estudos com microscopia intravital

Uma preparação envolvendo a exposição do músculo cremáster foi utilizada para experimentos de microscopia intravital em camundongos. Esses experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, sob a supervisão da Professora Dra. Denise Carmona Cara.

Os camundongos receberam tanto pré-tratamento sistêmico (sc; drogas antiinflamatórias e veículos) e/ou locais (intraescrotal; LPS ou veículo), descritos na seção de resultados. Os animais foram anestesiados com uma mistura de 200mg/Kg de ketamina e 10mg/Kg de xilasina e após completa indução anestésica uma pequena incisão foi feita na pele escrotal para expor o testículo direito e por sua vez o músculo cremáster. Esse músculo foi cuidadosamente dissecado e liberado da fáscia muscular associada cortado longitudinalmente utilizando um cauterizador. O testículo e o epidídimo foram separados da musculatura circundante e recolocados dentro da cavidade abdominal. O músculo foi então aberto em um campo plano, preso em um suporte ótico transparente e foi fixado ao longo das bordas com um fio de algodão fino. O tecido foi irrigado constantemente com um tampão de bicarbonato (37° C, pH 7.4). Um microscópio ótico (Olympus, Japão) com uma objetiva de aumento de 20 vezes e uma ocular de aumento 10 vezes foi utilizado para examinar a microcirculação do cremáster. Uma câmera de vídeo (Sony, Japão) foi usada para projetar as imagens em um televisor, e as imagens foram gravadas em um gravador de *DVDs* (Lg, Brasil) para a análise posterior.

Obtenção e análise das imagens da microscopia intravital

Foram gravados três intervalos de 5 minutos, com espaço entre eles de 15 minutos para estabilização da preparação. Vênulas retilíneas (25-40 μ m de diâmetro) foram selecionadas e, para minimizar a variabilidade, a mesma vênula foi sempre que possível observada durante todo o experimento. O número de leucócitos em rolamento, aderidos e migrados foi determinado posteriormente ao experimento. Os leucócitos em rolamento foram definidos como aqueles que se movem em uma velocidade menor do que aquela das hemácias dentro do fluxo observado. O número de células em rolamento foi medido pelo número de leucócitos em rolamento que passaram por um dado ponto na vênula por minuto. A velocidade do rolamento do leucócito foi medida pelas primeiras 20 células que passaram pelo campo de visão da gravação e calculado pelo tempo gasto para que um leucócito rolasse ao longo de um comprimento de 100 μ m da vênula. Um leucócito foi considerado estar aderido se este permaneceu no mínimo 30 segundos estacionado no endotélio e a adesão total foi determinada como o número de células aderentes dentro de um comprimento de 100 μ m da vênula em um intervalo de 5 min. O número de células migradas foi definido como o número de leucócitos no espaço extravascular dentro da área filmada pela câmera nos espaços juntos à vênula observada. Foram feitos cortes histológicos corados pelo método da hematoxilina e eosina (H&E) para a confirmação do tipo leucocitário que migrou para os espaços extravasculares.

Os parâmetros hemodinâmicos foram também avaliados. A velocidade das hemácias (V_{RBC}) foi medida usando um velocímetro ótico por Doppler (Microcirculation Research Institute). A velocidade das hemácias foi calculada a partir da velocidade principal ($V_{mean} = V_{RBC}/1.6$), assumindo a geometria do vaso como um cilindro. A taxa de stress por cisalhamento na parede da vênula (*venular wall shear rate*, γ) foi calculada baseada na definição Newtoniana: $\gamma = 8 (V_{mean}/D_v)$, sendo D_v o diâmetro da vênula em análise.

Após a finalização das gravações das imagens da microscopia intravital foi realizada uma punção cardíaca nos animais para obtenção do sangue circulante e para posterior contagem do número de leucócitos totais seguindo os mesmos protocolos anteriores.

Drogas, Solventes e Reagentes

Albumina bovina	Type V – Sigma-USA
Carragenina lambda (λ -Cg)	Sigma-USA
Celecoxibe	Celebra®, Phamacia, Pfizer
Heparina	Liquemine®, Roche
Indometacina	Sigma-USA
LPS <i>E. coli</i> , batch B1: 114	Sigma-USA
May-Grunwald	Solução 0,2% de azul de metileno
PBS	Lab. Inflamação e Dor, ICB-UFMG
Piroxicam	Feldene®, Pfizer
Prostaglandina E2 (PGE ₂)	Sigma-USA

Prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α})	Sigma-USA
Rofecoxibe	Vioxx®, MSD
SC236	Caymann Chemical Co – USA
SC560	Caymann Chemical Co – USA
Tampão Tris	Sigma-USA
Tween 85	Sigma-USA
Solução de lise de hemácias	Lab. Inflamação e Dor, ICB-UFMG
Solução irrigadora MIV	NIPE, ICB/UFMG

Análise estatística

As médias \pm erro padrão da média (e.p.m) dos dados obtidos foram comparadas com o resultado de animais controle injetados com os respectivos veículos, utilizando o *one-way* ANOVA com *Post Test* de Bonferroni ou Dunnet. Diferenças entre médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados por programa de computador (Prism 3.0) em ambiente Windows.

4- RESULTADOS

Efeito do LPS sobre o número e o tipo de leucócitos recrutados para o peritônio de ratos

O lavado peritoneal de um animal naive, isto é, que não sofreu nenhum tratamento, apresenta uma população de células composta por macrófagos residentes, linfócitos e uma pequena quantidade de eosinófilos.

Para estabelecer quais as doses ativas de LPS para indução de recrutamento celular sob nossas condições experimentais, obtivemos uma curva dose-resposta ao LPS. Como apresentado na Figura 1, a injeção intraperitoneal de LPS induziu recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal de ratos de maneira dose-dependente. As doses de 0,3 e 0,6 μ g/animal causaram um aumento significativo no número de células na 3^a hora quando comparado ao grupo controle e o aumento da dose de LPS para 3 e 30 μ g/animal (não apresentado) não se refletiu em maior aumento do número de células.

O aumento no número de células observado em relação ao grupo controle após 3 horas da injeção de LPS é principalmente devido ao aumento no número de neutrófilos, que corresponderam a aproximadamente 50% do total de células, como apresentado na Figura 2. O aumento no número de neutrófilos foi proporcional ao aumento da dose de LPS na faixa de doses entre 0,03 e 0,3 μ g/sítio, como apresentado na Figura 3. Nessa figura observamos que uma dose dez vezes maior foi capaz de duplicar o número de neutrófilos presentes no lavado peritoneal, atingindo valores similares na faixa de doses de LPS entre

0,3-3 μ g/sítio. Os outros tipos celulares se encontram distribuídos de acordo com a Figura 2.

Para se estudar cronologicamente o desenvolvimento do processo inflamatório induzido pela injeção intraperitoneal de LPS, a coleta das células foi realizada após diferentes tempos da administração de uma dose fixa de LPS. Como apresentado na Figura 4, após 3 horas da injeção intraperitoneal de LPS há um aumento significativo no número de células no lavado peritoneal, que se manteve no mesmo patamar até a 24^a hora. Cerca de 50% dessas células eram neutrófilos, em todos os tempos. Com base nos dados sobre expressão de COX-2 em processos inflamatórios, elegemos a 6^a hora como padrão para estudos posteriores envolvendo drogas antiinflamatórias. Os neutrófilos constituíram o principal tipo celular presente entre as células recuperadas do lavado peritoneal dos animais injetados com LPS, representando cerca da metade do total obtido, sendo que os outros tipos celulares (eosinófilos, linfócitos e mastócitos e macrófagos) se distribuíram em um padrão similar ao apresentado na Figura 2.

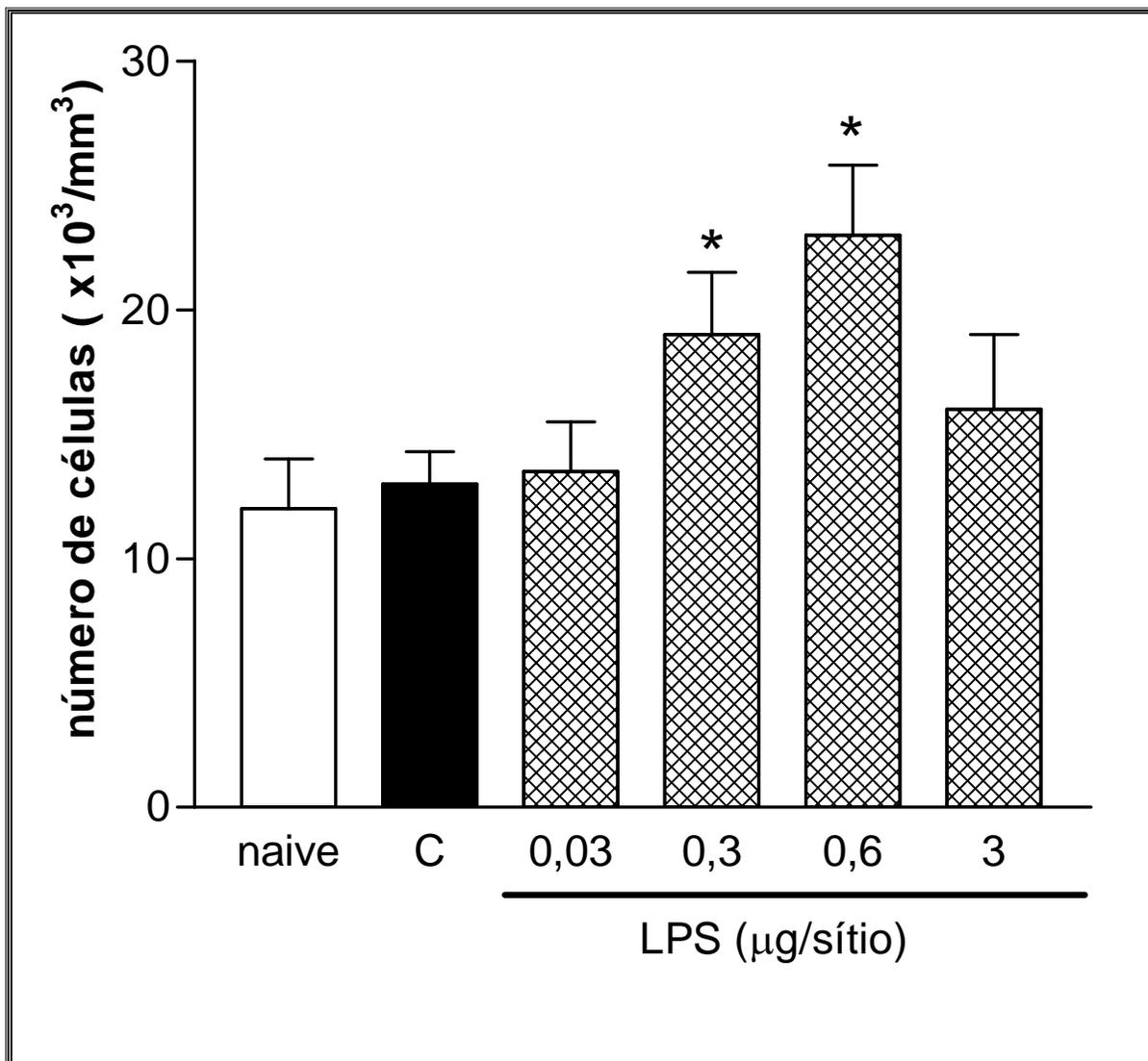


Figura 1 – Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos injetados com diferentes doses de endotoxina bacteriana (LPS, *E. coli*). O LPS foi diluído sob condições assépticas em salina fisiológica estéril e injetado intraperitonealmente (ip) no tempo zero nas doses indicadas. O número de células presentes no lavado peritoneal após 3 horas da injeção ip de LPS ou salina (C, 1ml/sítio) foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5-11.

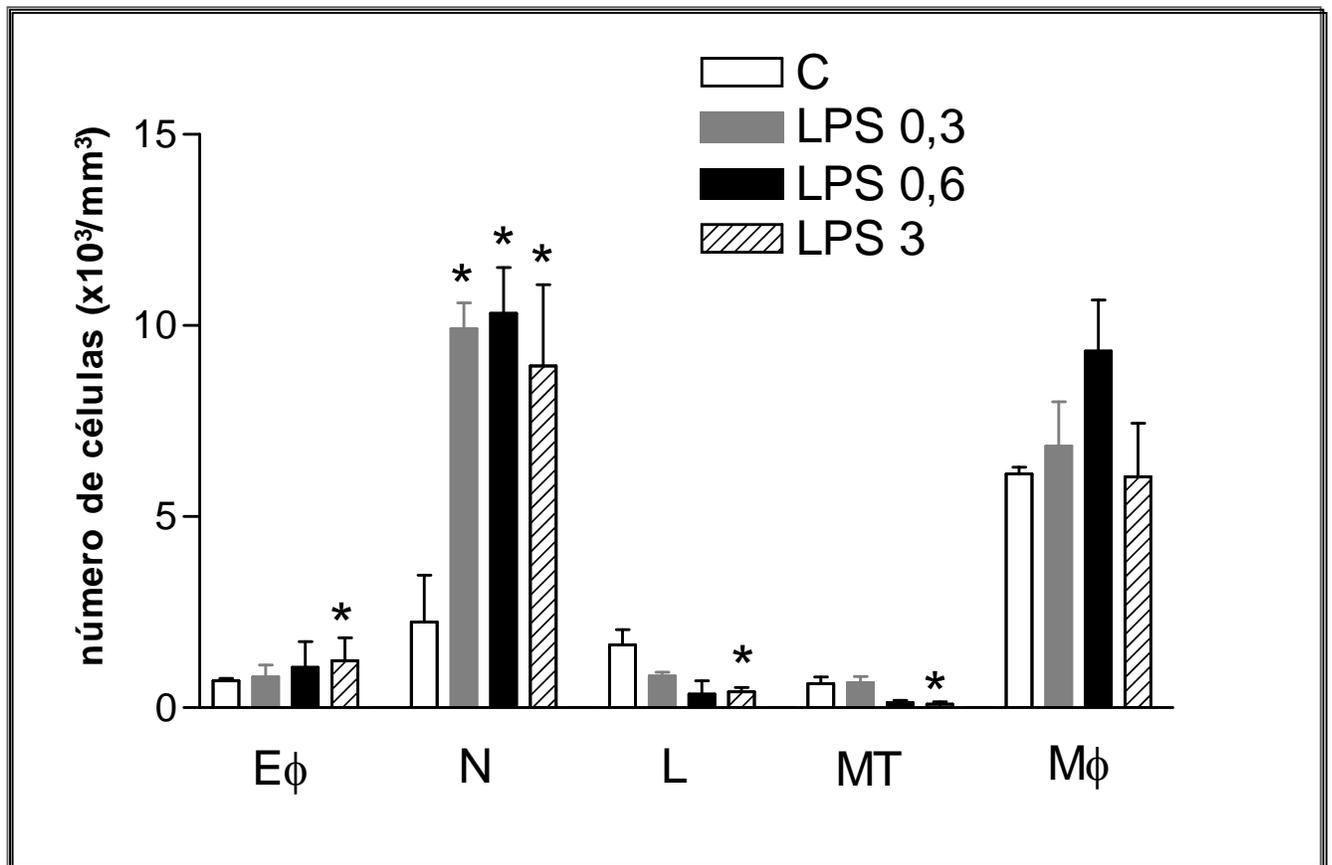


Figura 2 – Contagem específica dos leucócitos presentes no lavado peritoneal de ratos injetados com LPS. Os esfregaços, feitos com a ressuspensão do sedimento celular após 3 horas da injeção ip de LPS (nas doses apresentadas no gráfico - $\mu\text{g/sítio}$) ou salina (C, 1ml/sítio), foram corados pelo método May-Grunwald-Giemsa e contados sob microscopia de luz (imersão em óleo, aumento 1000x). *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. E Φ - eosinófilos, N- neutrófilos, L- linfócitos, MT- mastócitos, M Φ -macrófagos. N=5.

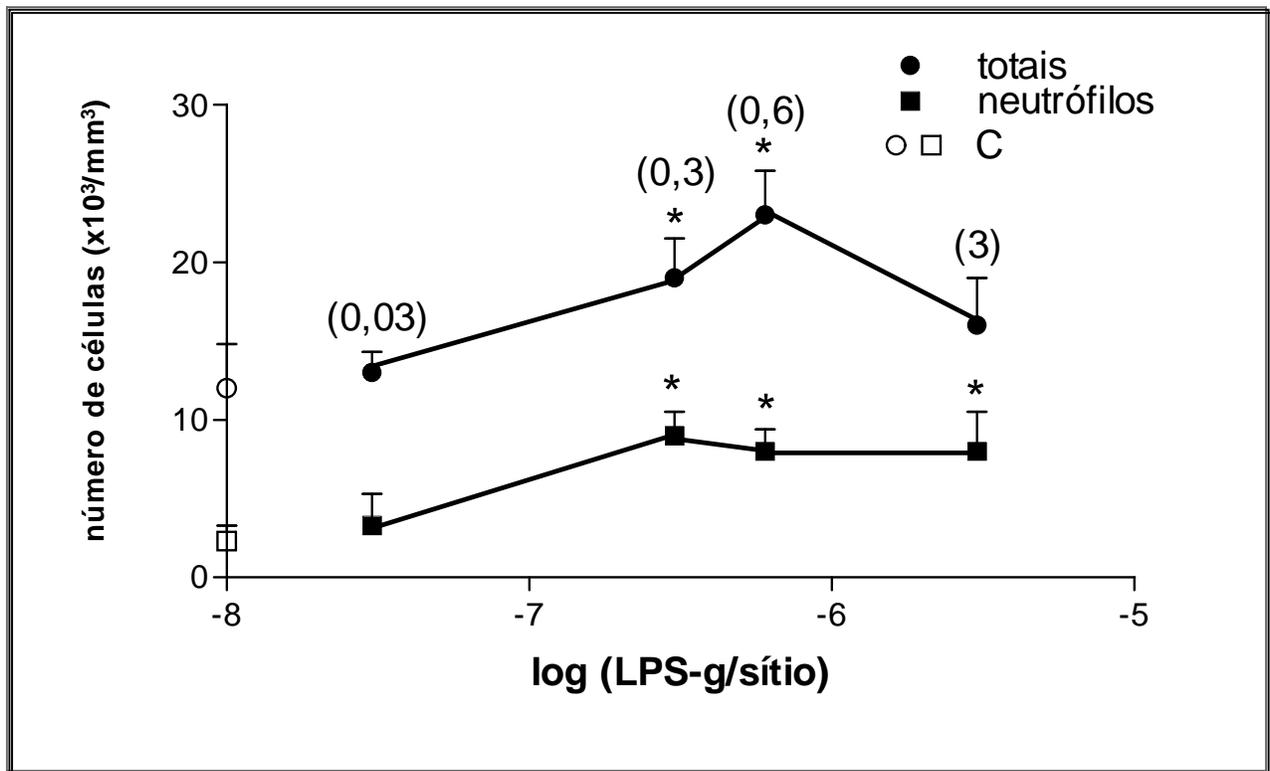


Figura 3 – Relação entre o aumento do número total de leucócitos e a de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos injetados com diferentes doses de endotoxina bacteriana. Os esfregaços foram feitos com a ressuspensão do sedimento celular após 3 horas da injeção ip de LPS ou salina (C, 1ml/sítio). As doses foram apresentadas em escala logarítmica (g/sítio), sendo que ●/■ indicam número total de células e número de neutrófilos, respectivamente, e ○/□ indicam respectivos grupos controle. Os números entre parênteses indicam as doses em µg/sítio. *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle. N=5.

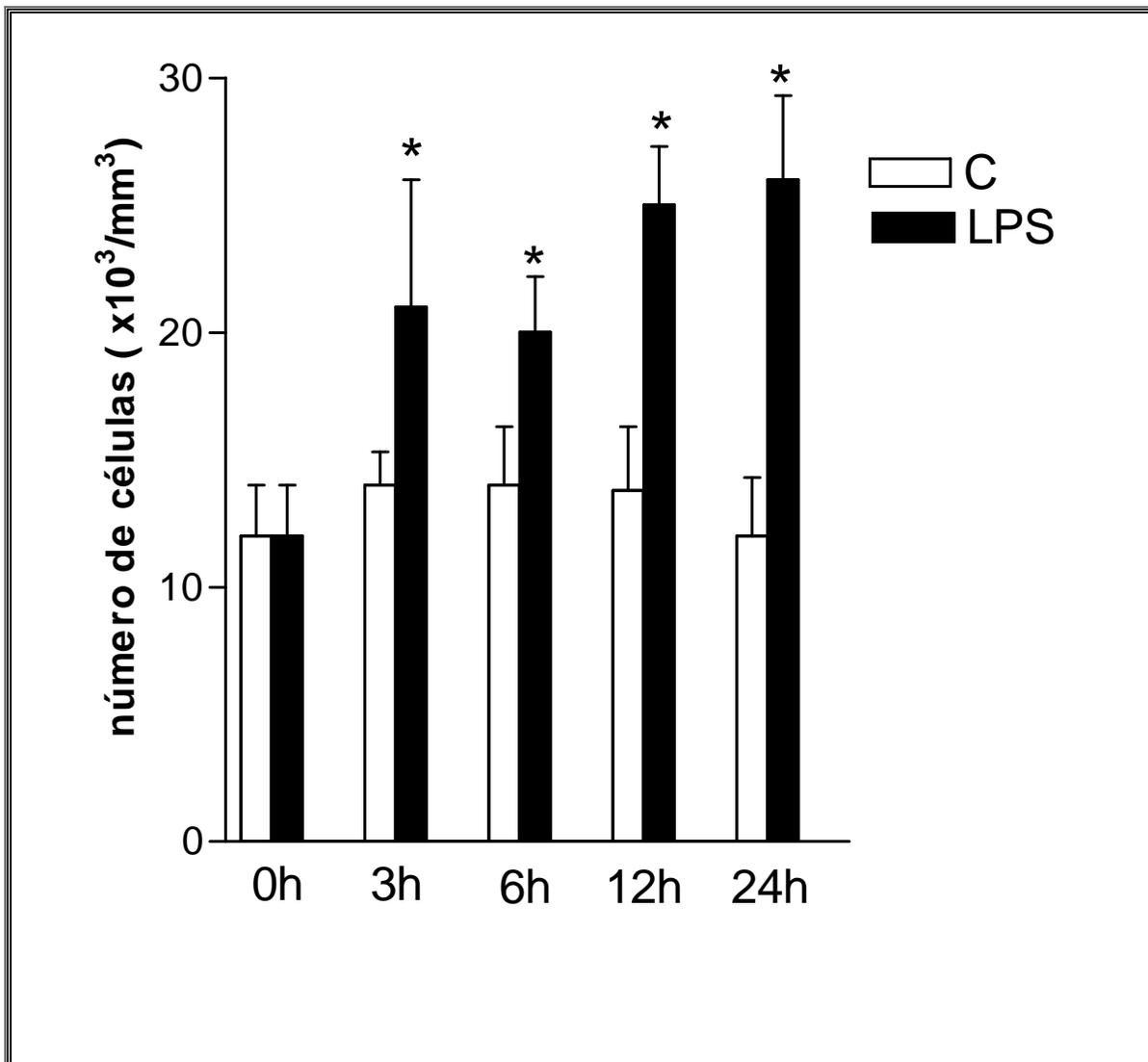


Figura 4 – Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos injetados com LPS após diferentes tempos. O LPS (0,3 μ g/sítio) foi diluído sob condições assépticas em salina fisiológica estéril e injetado intraperitonealmente (ip) nos tempos indicados no gráfico. O número de células presentes no lavado peritoneal após a injeção ip de LPS ou salina (C, 1ml/sítio) foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5.

Estudo do efeito dos inibidores de ciclooxigenases (COXs) no recrutamento leucocitário induzido por LPS

Inibidores não-seletivos de ciclooxigenases

O pré-tratamento dos animais com 2mg/Kg de indometacina reduziu significativamente o número de células presentes no lavado peritoneal de animais tratados com LPS. Em contrapartida, o pré-tratamento dos animais com piroxicam (3 ou 20 mg/Kg, sc) não inibiu o recrutamento leucocitário induzido por LPS (Figura 5). A redução estatisticamente significativa do número de neutrófilos foi observada somente no grupo pré-tratado com indometacina (dados não apresentados).

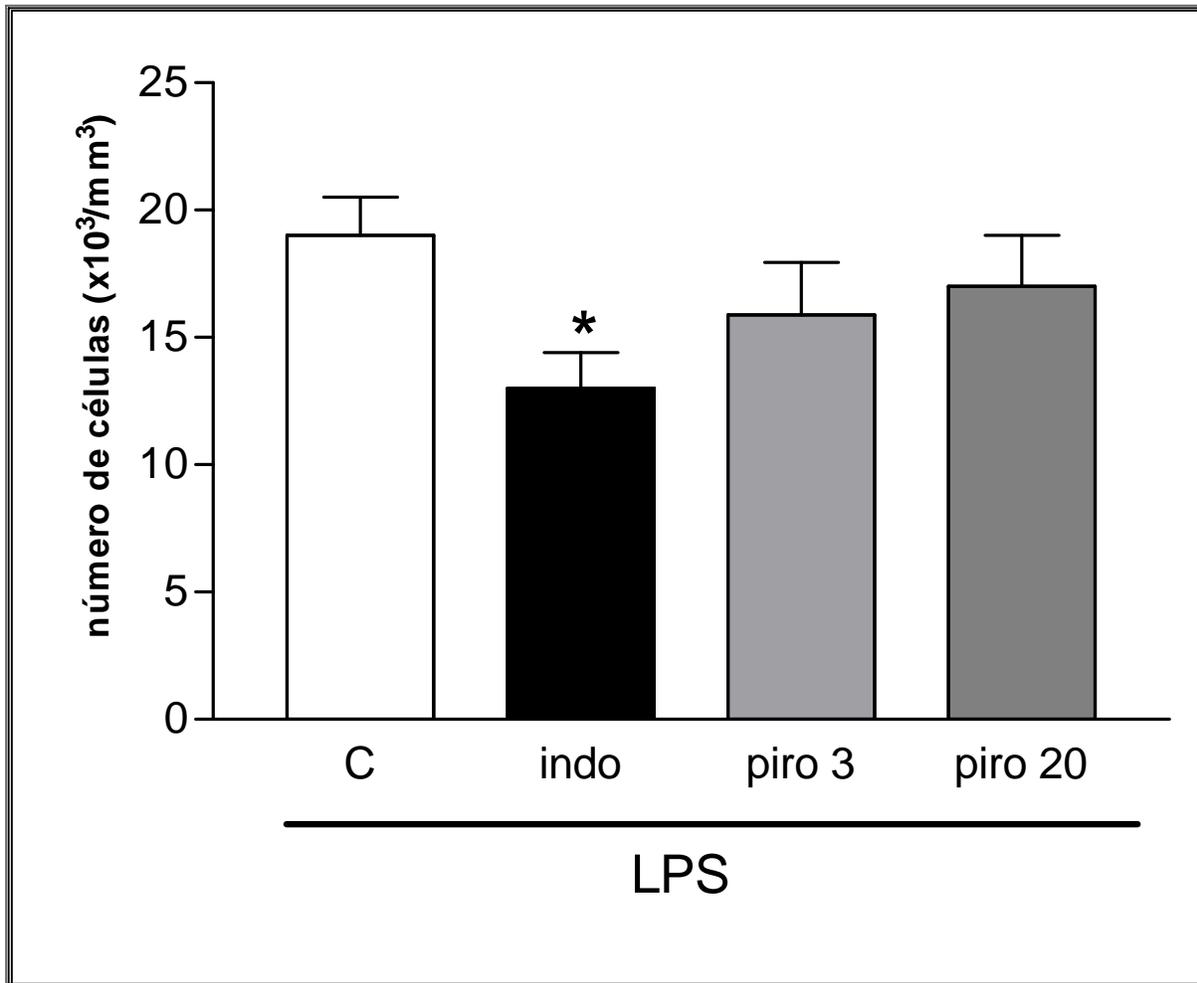


Figura 5 – Efeito dos inibidores não-seletivos de ciclooxygenases indometacina (indo) e piroxicam (piro) no recrutamento celular induzido por LPS. Indometacina 2mg/Kg e piroxicam (3 e 20mg/Kg) foram administrados por via subcutânea trinta minutos antes da injeção ip de LPS (0,3µg/sítio). O número de células presentes no lavado peritoneal após 6 horas da injeção ip de LPS foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). C - indica pré-tratamento subcutâneo com salina . *- indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5.

Estudo do efeito do inibidor seletivo de COX-1

Para estudarmos a participação da ciclooxigenase-1 neste modelo de migração leucocitária, um inibidor seletivo de COX-1, o composto experimental SC560, foi utilizado. As doses escolhidas para o teste se mostraram efetivas como analgésicas no modelo de hiperalgisia induzido pela carragenina na pata de rato, realizado em nosso laboratório (FRANCISCHI *et al.* 2002, FRANCA *et al.* 2006) e são capazes de inibir quantidades significativas de COX-1 (SMITH *et al.*, 1998).

O pré-tratamento dos animais com 1 ou 5mg/Kg de SC560 não inibiu o recrutamento celular induzido por LPS, como apresentado na Figura 6. Ainda, não houve nenhuma alteração significativa na contagem específica dos leucócitos em relação ao grupo controle em ambas as doses estudadas.

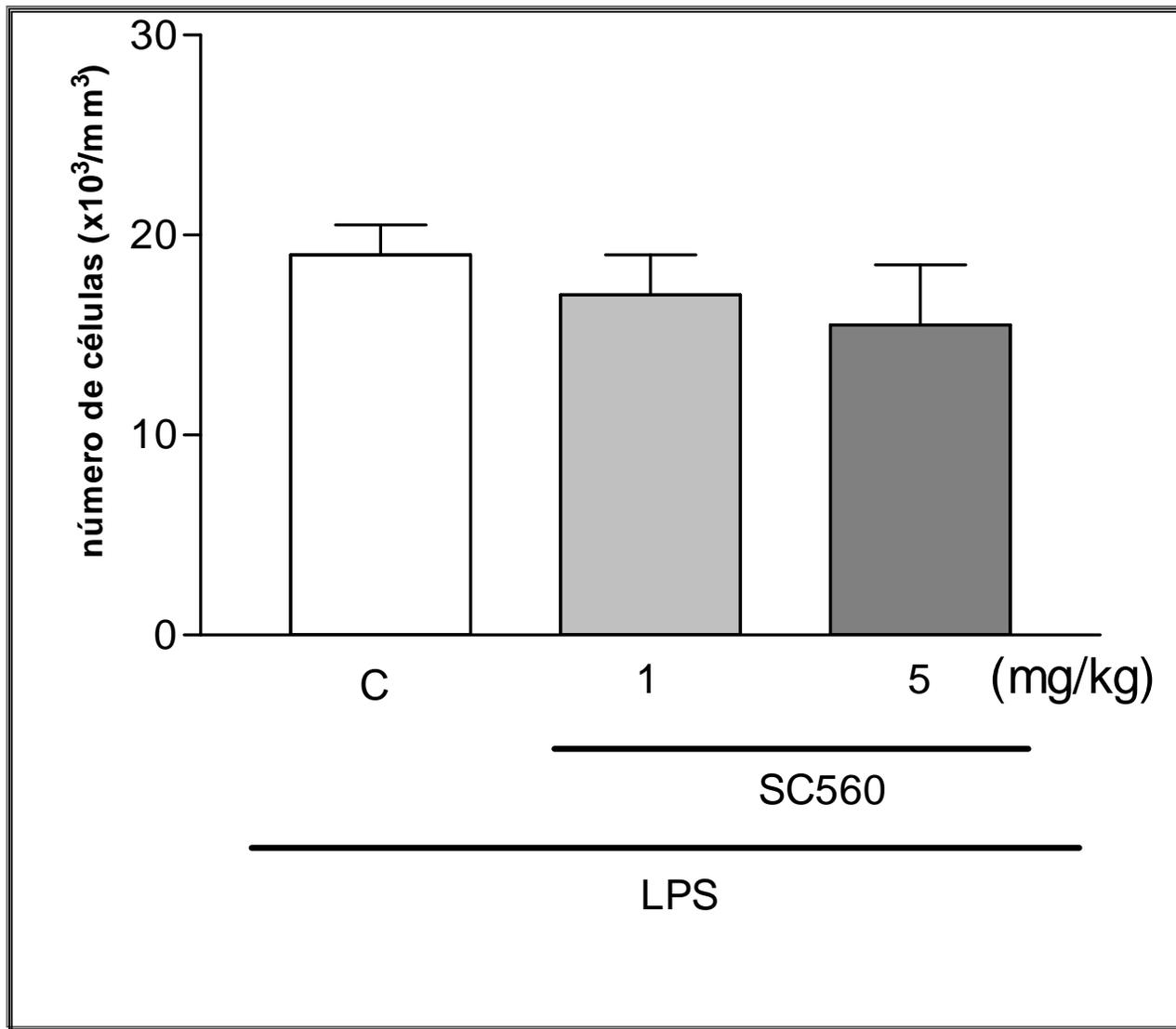


Figura 6 – Falta de efeito do SC560 sobre o recrutamento de leucócitos induzido por LPS na 6^a hora. O SC560 (1 ou 5mg/kg) ou salina (C, 1ml/Kg) foram injetados por via subcutânea trinta minutos antes da injeção ip de LPS (0,3µg/sítio). O número de células presentes no lavado peritoneal após 6 horas da injeção ip do agente flogógeno foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle. N=5.

Inibidores seletivos de COX-2

Para estudarmos os efeitos dos inibidores seletivos de COX-2 sobre o recrutamento leucocitário induzido por LPS, utilizamos dois antiinflamatórios com formulações comerciais diferentes (celecoxibe e rofecoxibe) e um composto experimental (SC 236)

Estudo do efeito do celecoxibe

O tratamento de um grupo de animais com celecoxibe (12mg/kg), sem nenhuma injeção de agentes pró-inflamatórios, não causou nenhum efeito na população de células residentes da cavidade peritoneal, em relação a um animal naíve (dados não apresentados).

O pré-tratamento dos animais com celecoxibe reduziu de maneira dose-dependente o número de células no lavado peritoneal de animais injetados com LPS. Administrando-se doses na faixa entre 6-12mg/kg observou-se redução significativa no número de células presentes no lavado peritoneal após 6 horas da injeção de LPS, como apresentado na Figura 7. O aumento da dose de celecoxibe para 30mg/kg não refletiu em maior redução no número de células na cavidade peritoneal. A inibição dose-dependente do recrutamento de neutrófilos contribuiu significativamente para redução no número de células totais em animais tratados com LPS (Figura 8). Estudou-se ainda o efeito do celecoxibe após 3 horas de injeção intraperitoneal de LPS e não foi observado o efeito inibitório sobre a migração celular nesse tempo (dados não apresentados).

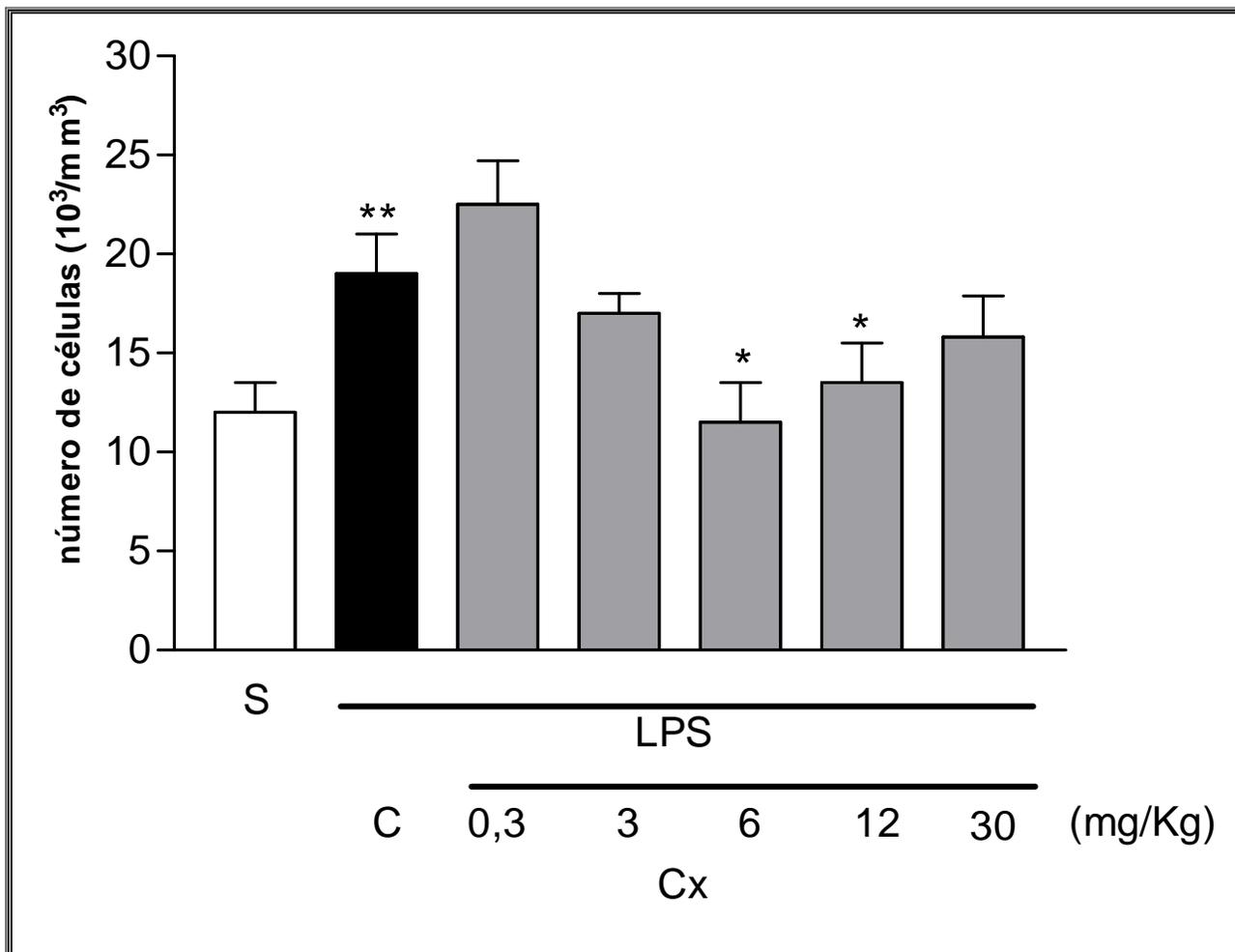


Figura 7 – Estudo do efeito do celecoxibe sobre o recrutamento celular induzido por LPS em ratos – Curva dose-resposta. O celecoxibe foi injetado por via subcutânea nas doses indicadas no gráfico (Cx, mg/kg) 30 minutos antes da injeção ip de LPS (C, 0,3 μ g/sítio). O número de células presentes no lavado peritoneal após 6 horas da injeção ip de LPS ou salina (S, 1ml/sítio) foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e **-em relação ao grupo salina. N=5-10.

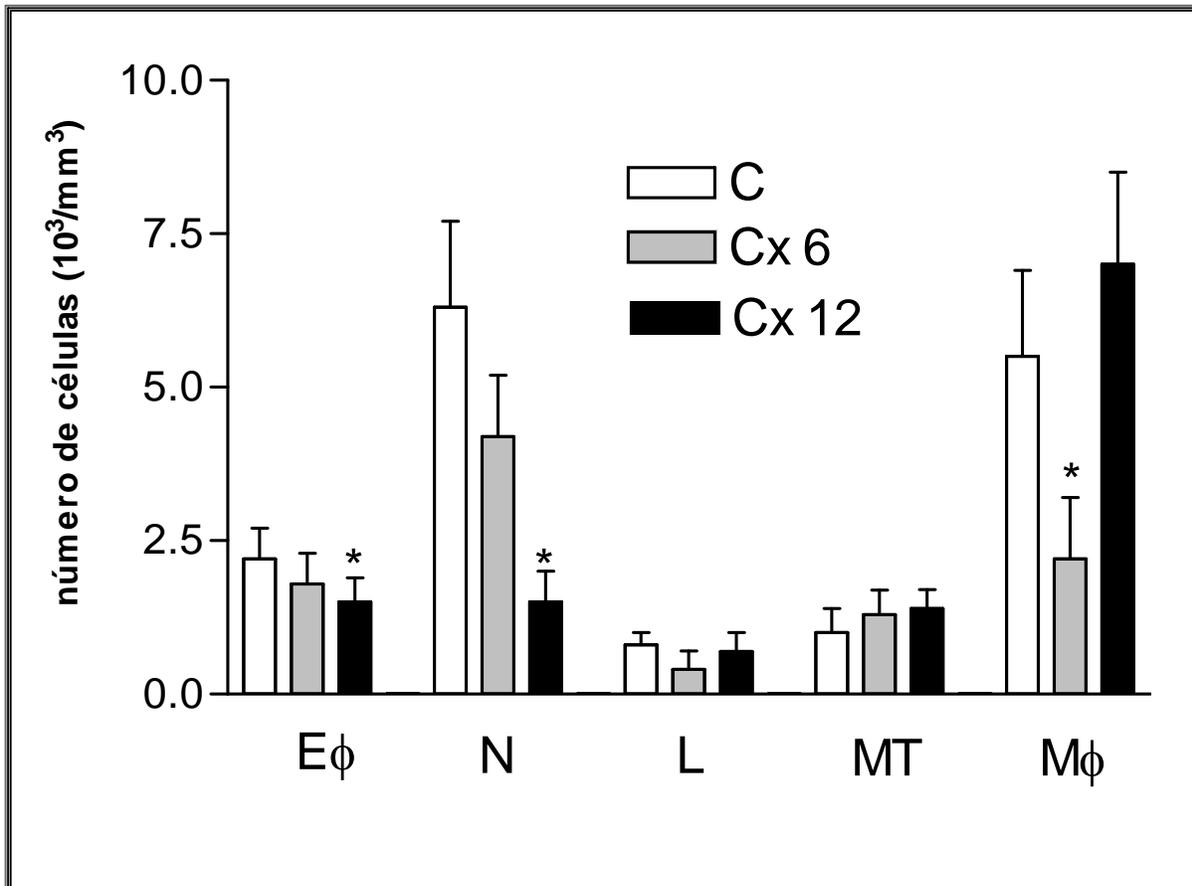


Figura 8 – Contagem específica dos leucócitos presentes no lavado peritoneal de ratos pré-tratados com celecoxibe. Os animais foram pré-tratados com celecoxibe (Cx ; 6 e 12mg/Kg, sc) trinta minutos antes da injeção ip de LPS (na dose de 0,3 μ g/sítio). Os esfregaços, feitos com a ressuspensão do sedimento celular após 6 horas da injeção do estímulo inflamatório, foram corados pelo método May-Grunwald-Giemsa e contados sob microscopia de luz (imersão em óleo, aumento 1000x). *- indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. E Φ - eosinófilos, N- neutrófilos, L- linfócitos, MT- mastócitos, M Φ - macrófagos. N=5-10.

Estudo do efeito do rofecoxibe e do composto experimental SC236

Após estabelecermos o perfil de ação do celecoxibe, foram estudados outros dois inibidores seletivos de COX-2: rofecoxibe e o composto experimental SC236.

Como apresentado na Figura 9, o pré-tratamento dos animais com 0,7mg/Kg de rofecoxibe inibiu a migração celular total induzida por LPS, principalmente por inibição da migração de neutrófilos (dados não demonstrados). Ainda, foi observada uma redução no número de linfócitos nos grupos tratados com doses na faixa de 0,35-0,7mg/Kg. A administração de SC 236 (12mg/Kg) inibiu o recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal de ratos injetados intraperitonealmente com LPS na 6^a hora. Novamente, o número de neutrófilos e linfócitos (dados não demonstrados) foi o principal responsável por tal redução no número total de células, observando-se ainda redução do número de mastócitos. O perfil de ação desses medicamentos também foi estudado na 3^a hora. O pré-tratamento dos animais com esses inibidores de ciclooxigenase-2, sob tais condições, não inibiu o recrutamento celular induzido por LPS nesse tempo. Interessantemente, o número de linfócitos apresentou-se reduzido em ambos os grupos pré-tratados com drogas também nesse tempo estudado.

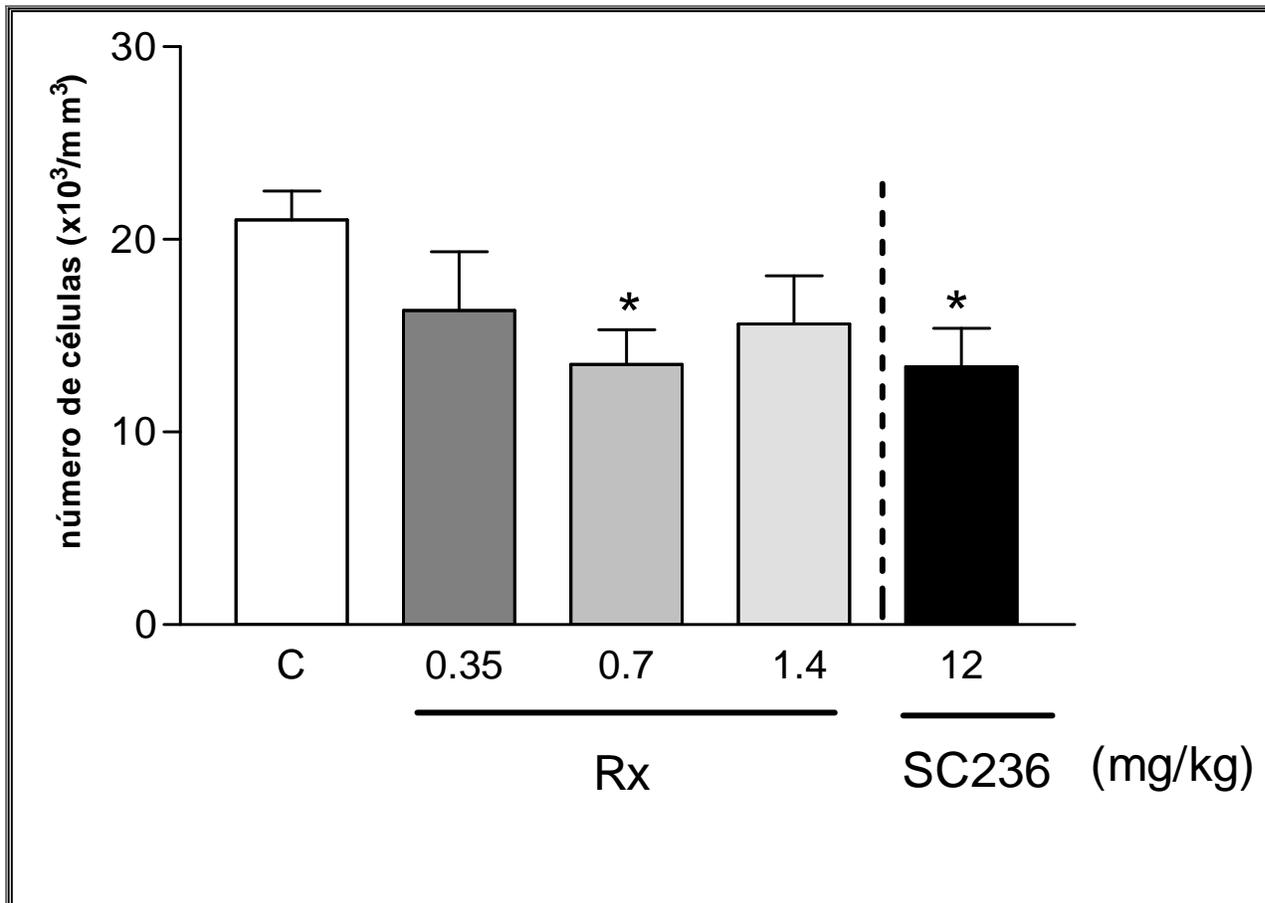


Figura 9 – Estudo do efeito do rofecoxibe e do SC236 sobre o recrutamento celular induzido por LPS em ratos. O rofecoxibe (Rx) e o SC236 foram injetados por via subcutânea nas doses indicadas no gráfico (mg/kg) 30 minutos antes da injeção ip de LPS (C, 0,3µg/sítio). O número de células presentes no lavado peritoneal após 6 horas da injeção ip de LPS foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). *-indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5.

Estudo do efeito de prostaglandinas no recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal de ratos: estudo da participação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α})

Os dados obtidos com o estudo dos efeitos dos inibidores de COX-2 sugerem que mediadores inflamatórios lipídicos podem estar envolvidos na migração leucocitária induzida neste modelo.

A partir de um estudo *in vitro*, ARNOULD *et al* (2001) demonstraram que PGF_{2α} é um agente quimiotático para neutrófilos. Mais recentemente, foi descrito que esse prostanóide, juntamente com seu estereoisômero 9α,11β-PGF_{2α}, é um agonista para receptores quimiotáticos CRTH2 (*chemoattractant receptor homologous molecule expressed by Th2 cells*), reforçando a hipótese de que esse prostanóide pode exercer um papel importante na quimiotaxia de leucócitos (SANDIG *et al*, 2005). Com base nesses dados, iniciou-se o presente estudo utilizando a dosagem desse prostanóide nos lavados peritoneais de animais injetados com LPS.

O tratamento dos animais com PGF_{2α} (nas doses 1-1000 ng/sítio) induziu migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos após 3 horas da injeção ip do mediador inflamatório de maneira dose-dependente (Figura 10). Ainda, o aumento no número de neutrófilos, como demonstra a Figura 11, foi o principal responsável pelo aumento do número total de células (50-60%), sendo que a distribuição dos outros tipos celulares similar ao apresentado pelos demais agentes flogógenos.

Porém, a injeção intraperitoneal de prostaglandina E_2 , na mesma faixa de dose utilizadas pela $PGF_{2\alpha}$, não induziu migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais e nenhuma alteração significativa foi observada na contagem específicas dos leucócitos (dados não apresentados).

De maneira complementar, foram realizados experimentos para estudarmos se o pré-tratamento dos animais com doses efetivas de inibidores de COX-2 afetaria o recrutamento leucocitário induzido pela $PGF_{2\alpha}$. Interessantemente não foi observada nenhuma alteração no número de células presentes na cavidade peritoneal dos animais tratados tanto com celecoxibe quanto com rofecoxibe (dados não apresentados).

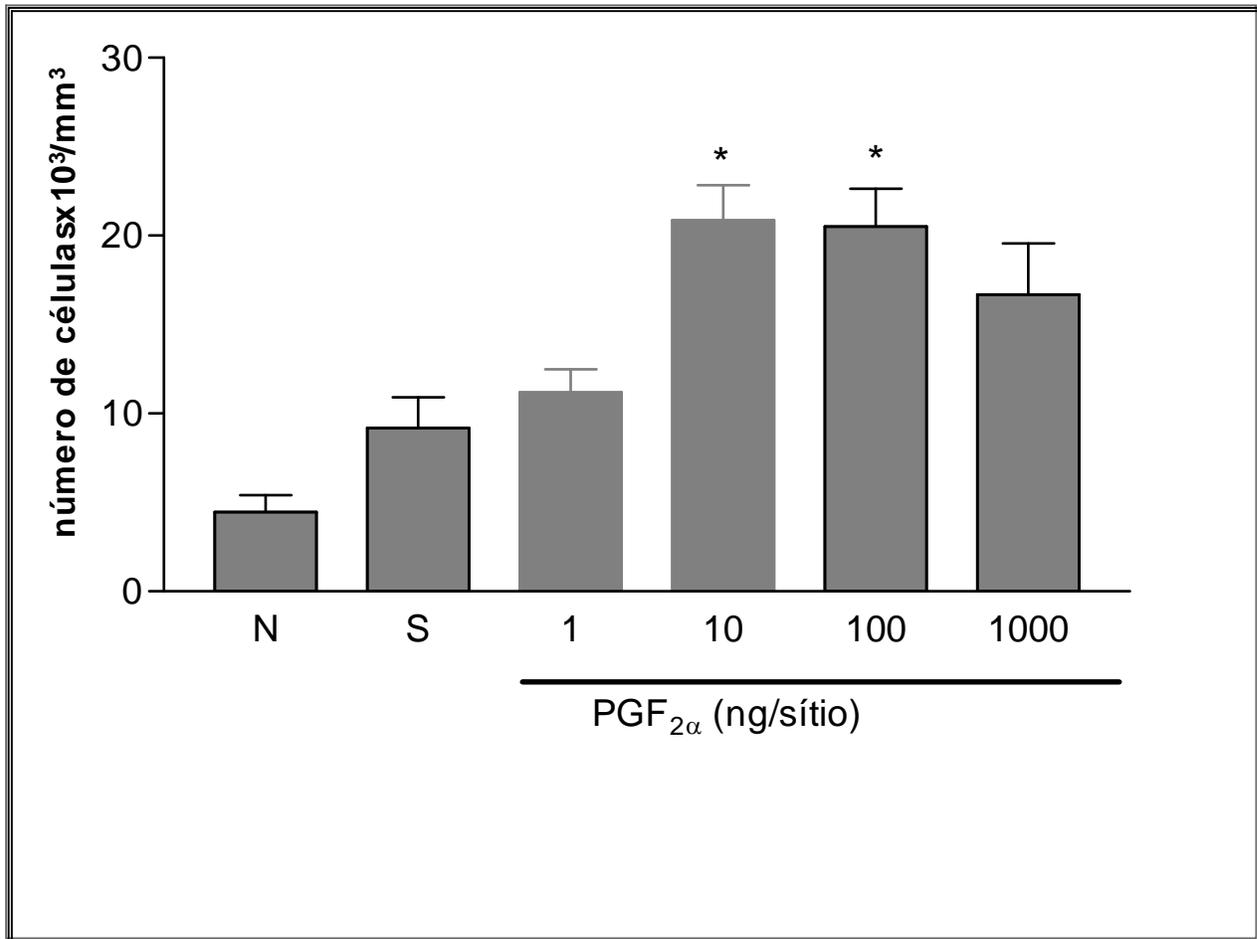


Figura 10 – Estudo do efeito da injeção intraperitoneal de prostaglandina F_{2α} na cavidade peritoneal de ratos na 3^a hora. Os animais foram injetados intraperitonealmente com PGF_{2α} (1-1000ng/sítio) ou salina (C, 1ml/sítio). O número de células presentes no lavado peritoneal após 3 horas da injeção ip do mediador inflamatório ou salina foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). N=5. *- indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle.

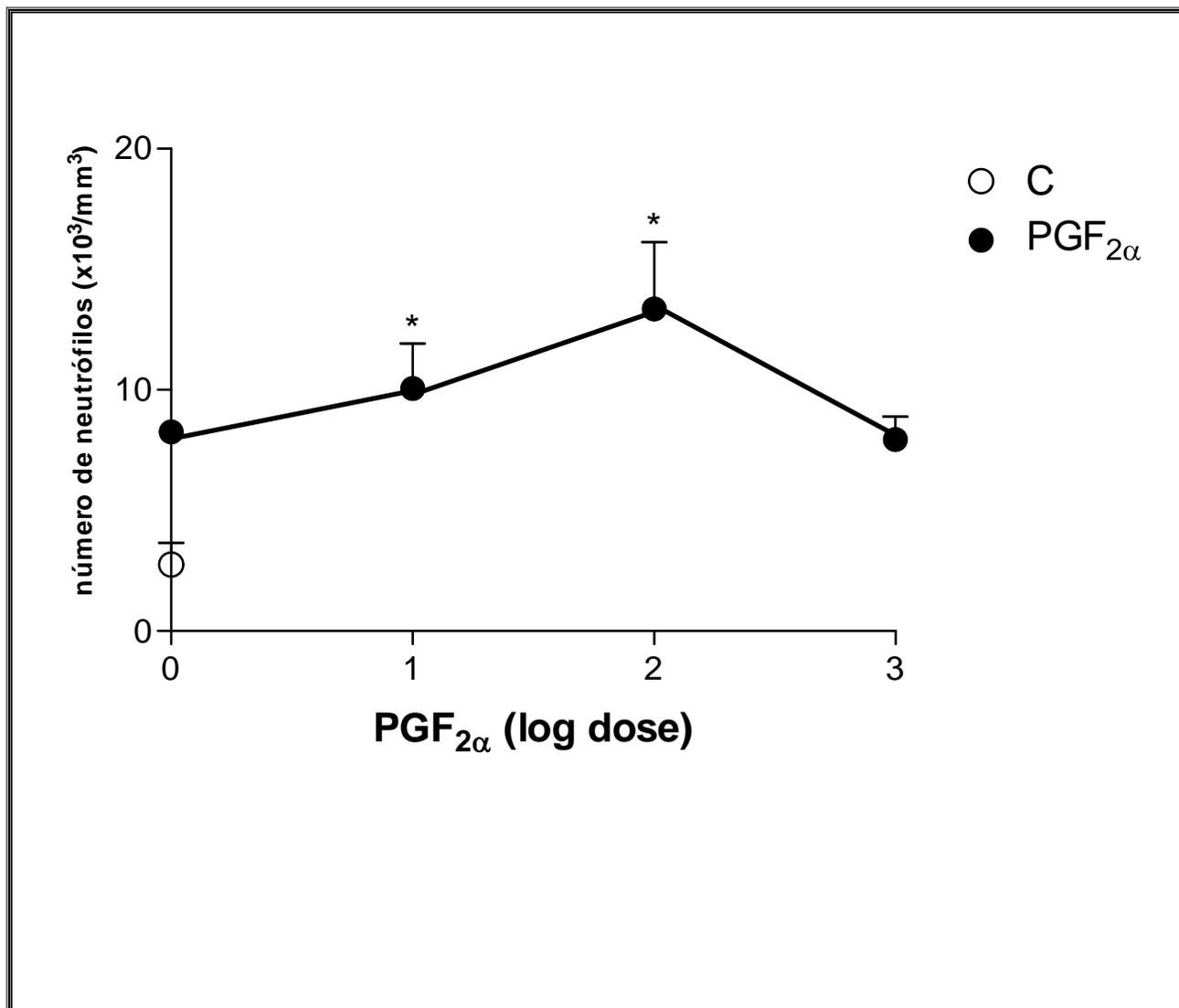


Figura 11 – Estudo do efeito da injeção de prostaglandina F_{2α} na cavidade peritoneal de ratos na 3^a hora – Participação dos neutrófilos. Os animais foram injetados intraperitonealmente com PGF_{2α} (log 0-3, correspondente às doses em ng/sítio) ou salina (C, 1ml/sítio). O número de células presentes no lavado peritoneal após 3 horas da injeção ip do mediador inflamatório ou salina foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). O círculo vazio (○) indica injeção intraperitoneal de salina. *- indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle (C). N≥5.

Estudo do efeito da reposição de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) nos animais pré-tratados com rofecoxibe e injetados intraperitonealmente com LPS

A reposição de $PGF_{2\alpha}$ nos animais pré-tratados com rofecoxibe e injetados intraperitonealmente com LPS restabeleceu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal anteriormente inibida pelo tratamento com o inibidor de COX-2, como demonstra a Figura 12.

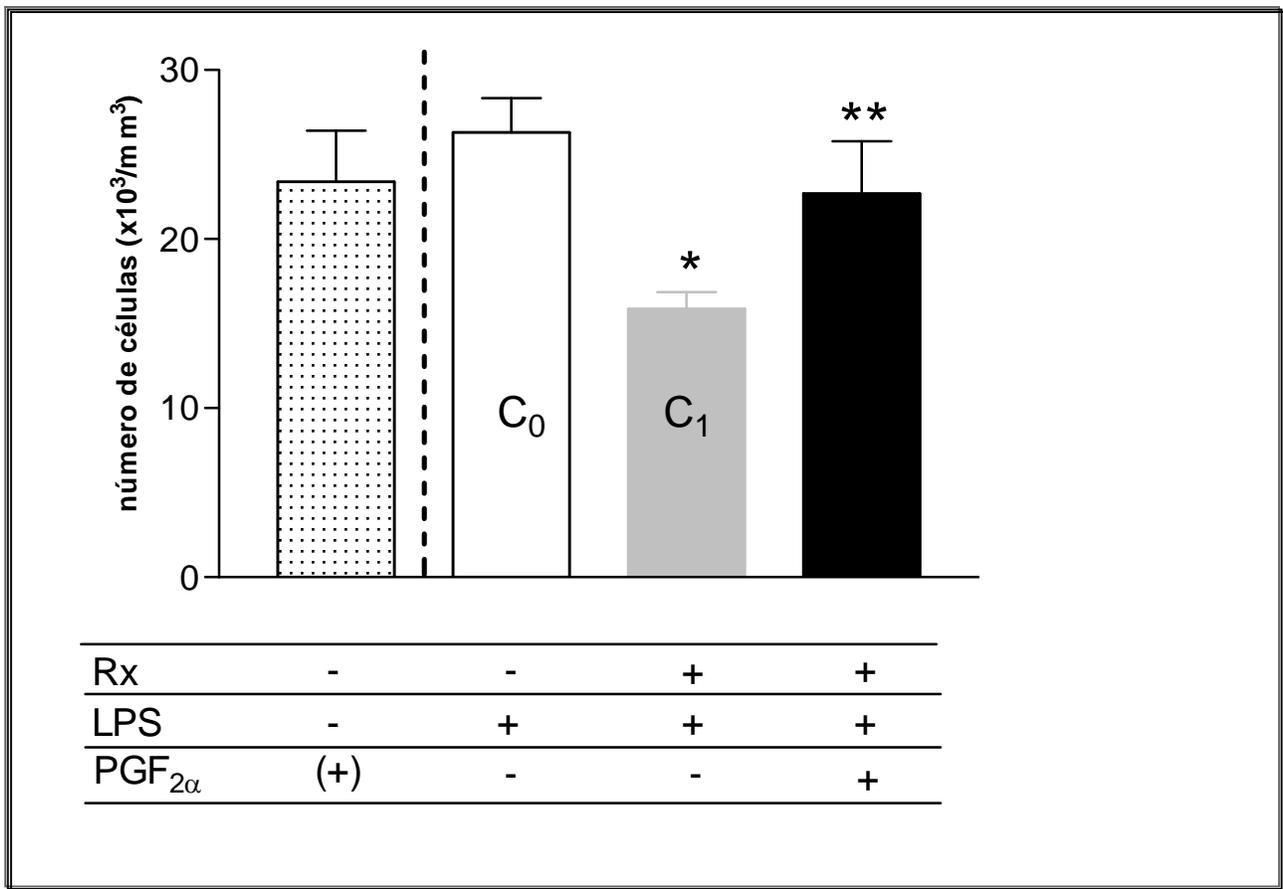


Figura 12 - Estudo do efeito da reposição de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) em animais pré-tratados com rofecoxibe e injetados intraperitonealmente com LPS. Os animais foram pré-tratados com rofecoxibe (sc; 0,7mg/Kg) trinta minutos antes da injeção ip de LPS (0,3μg/sítio). Três horas após a injeção da endotoxina, os animais receberam uma injeção ip de PGF_{2α} (10ng/sítio). O lavado peritoneal foi colhido 3 horas após a injeção intraperitoneal de PGF_{2α}. O sinal + indica tratamento com droga representada na tabela de tratamentos. O sinal – indica ausência da substância e (+) indica uma única injeção da substância indicada três horas antes da coleta do lavado peritoneal. * - indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C₀ e ** em relação ao grupo C₁ (p<0.05). N≥5.

Dosagem dos níveis de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ no lavado peritoneal de animais injetados com LPS

Demonstrada a participação da $PGF_{2\alpha}$ nesse modelo de estudo, seguiu-se a dosagem dos níveis desse mediador no lavado peritoneal dos animais sob diferentes condições.

Em condições de normalidade, um animal que não foi exposto a nenhum estímulo (naive) já apresenta níveis detectáveis de $PGF_{2\alpha}$ e a injeção de salina não alterou significativamente tais níveis na primeira meia hora. O pico de liberação de $PGF_{2\alpha}$ parece acontecer após quinze minutos da injeção intraperitoneal de LPS, mantendo-se expressiva até a meia hora, regredindo posteriormente, particularmente após a 3ª hora a injeção. Há um aumento de aproximadamente 170% nos níveis de $PGF_{2\alpha}$ nos quinze primeiros minutos no grupo tratado com LPS em relação ao grupo tratado com salina, caindo para aproximadamente 80% na meia hora inicial (Figura 13).

Os níveis de $PGF_{2\alpha}$ nos animais tratados com LPS foram significativamente maiores na primeira do que na terceira e sexta horas, assim como no grupo controle. Interessantemente, os níveis de $PGF_{2\alpha}$ nos animais tratados com salina encontraram-se elevados na primeira hora em relação aos primeiros instantes do processo inflamatório, apresentando uma redução acentuada na 3ª e na 6ª horas, assim como nos animais tratados com LPS.

Apresentando os dados dos níveis de $PGF_{2\alpha}$ e número de leucócitos conjuntamente, observamos que nos estágios iniciais na inflamação induzida por

LPS o número de leucócitos aumenta em concordância com os níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ até aproximadamente a primeira hora. Após esse instante, o aumento no número de leucócitos aconteceu independentemente dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Para estudarmos o efeito dos inibidores de ciclooxigenases sobre os níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dosados no lavado peritoneal, foi realizado um pré-tratamento com um inibidor preferencial de COX-1 (piroxicam) e com um inibidor seletivo de COX-2 (SC236) em animais posteriormente injetados intraperitonealmente com LPS.

Conforme apresentado na Tabela 1, observou-se uma redução de 45% nos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em animais tratados com piroxicam e com SC236, em relação aos animais controle. Entretanto, tais diferenças não se apresentaram significativas ($p > 0,05$).

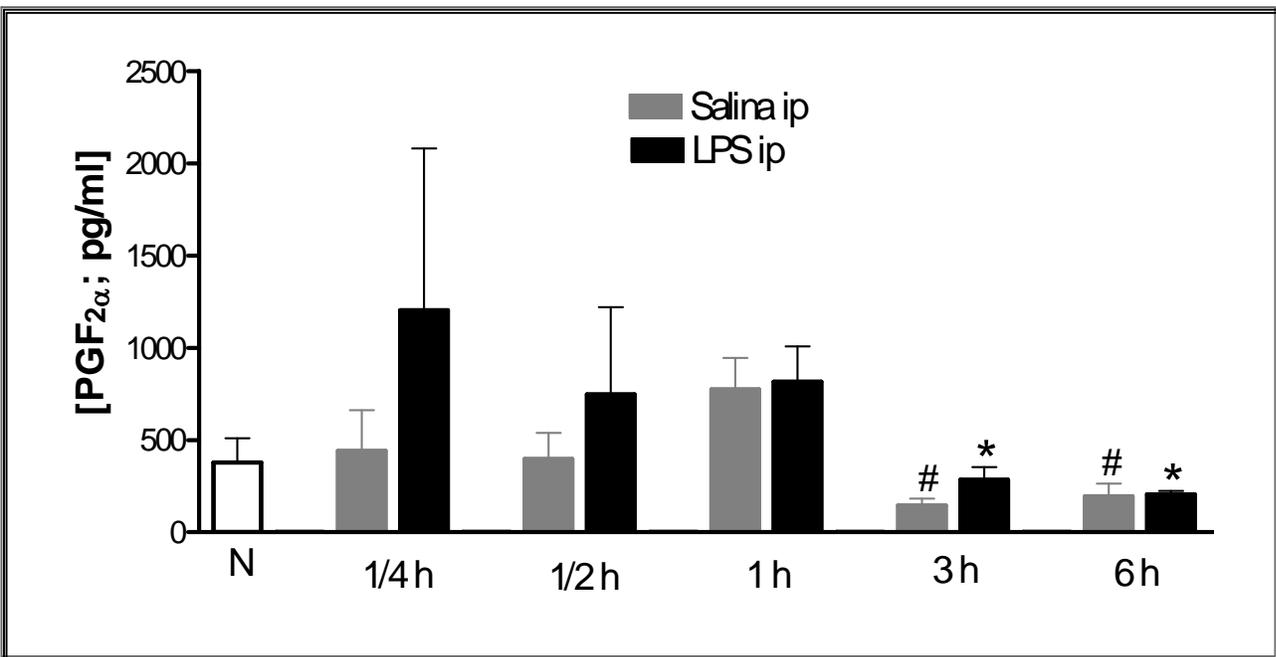


Figura 13 – Curva tempo-resposta da dosagem dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lavado peritoneal de animais tratados com LPS. Os animais foram injetados intraperitonealmente com LPS ($0,3\mu\text{g}/\text{animal}$) ou salina no tempo zero. O resultado de animais que não sofreram nenhum tratamento também é apresentado (N, naive). O lavado peritoneal foi coletado nos diferentes tempos indicados no gráfico (em 3mL de PBS) e centrifugado. O sobrenadante foi reservado para dosagens dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ através de ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante. * e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1h (N=5, $p < 0,05$, one-way ANOVA).

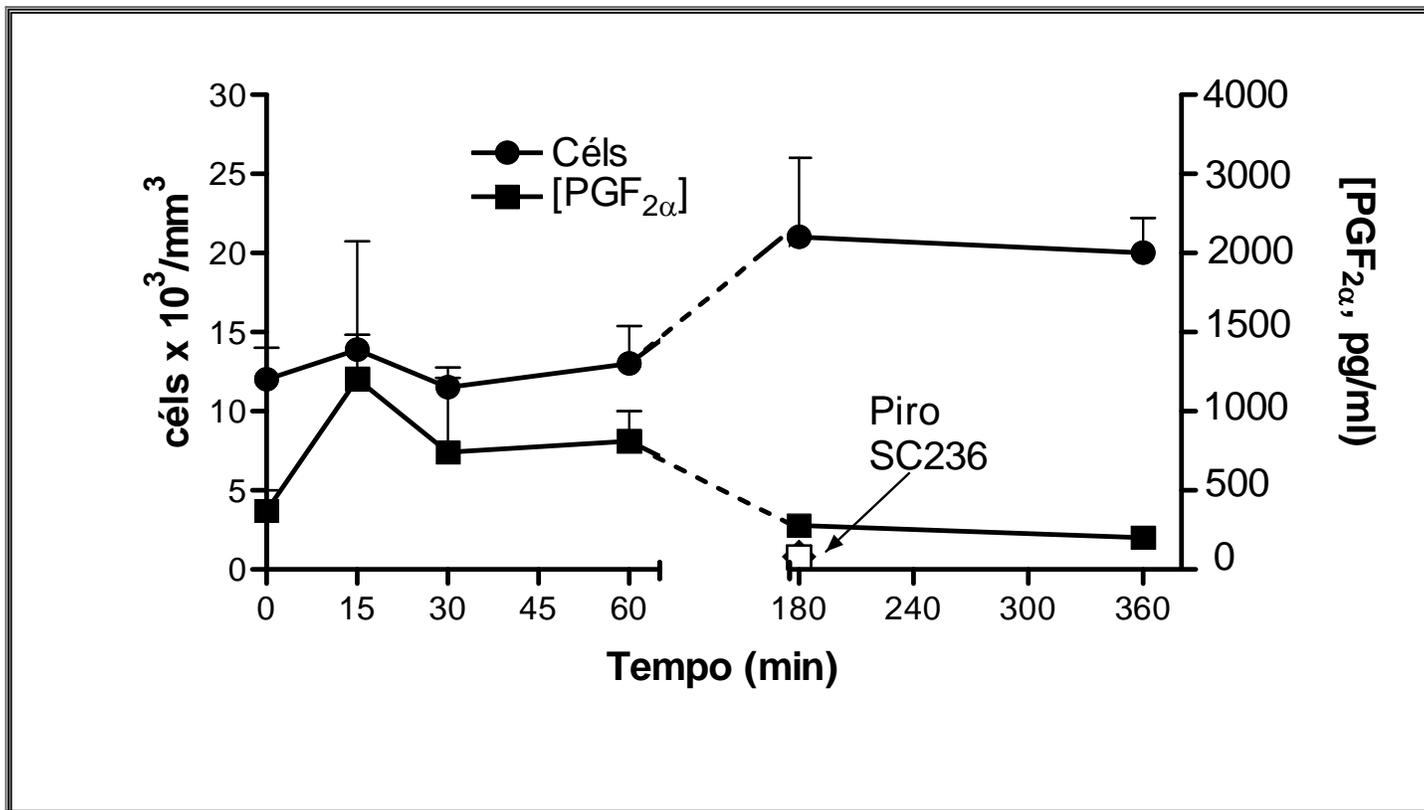


Figura 14 – Relação cronológica entre número de leucócitos e níveis de PGF_{2α} após injeção intraperitoneal de LPS. Os animais foram injetados intraperitonealmente com LPS (0,3μg/animal) ou salina no tempo zero. O resultado de animais que não sofreram nenhum tratamento também é apresentado (tempo zero). O lavado peritoneal foi coletado nos diferentes tempos indicados no gráfico (em 3mL de PBS) e centrifugado. O sobrenadante foi reservado para dosagens dos níveis de PGF_{2α} através de ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante e o número de células foi quantificado em câmara de Neubauer. N=5. As drogas indicadas no gráfico foram injetadas 30 minutos antes do LPS (piroxicam 20mg/Kg e SC236 12mg/Kg, sc).

Tabela 1 – Dosagem dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lavado peritoneal de animais pré-tratados com inibidores de ciclooxigenases e injetados com LPS.

Tratamento	Tempo de coleta	[$\text{PGF}_{2\alpha}$] pg/ml (média \pm e.p.m.)
C (sc)	½ h	132.7 \pm 45.6
LPS (ip)	½ h	269.5 \pm 61.4
C (ip)	3 h	161.2 \pm 49.6
LPS (ip)	3 h	138.9 \pm 27.7
SC 236	3 h	81.49 \pm 20.8
Piroxicam	3h	75.64 \pm 20.1

Os animais foram pré-tratados com SC 236 (12mg/Kg) ou piroxicam (20mg/Kg) injetados intraperitonealmente com LPS (0,3 μ g/animal) ou salina no tempo zero. O lavado peritoneal foi coletado nos diferentes tempos indicados na tabela (em 3mL de PBS) e centrifugado. O sobrenadante foi reservado para dosagens dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ através de ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as instruções dos kits. N=3-6.

Estudo do efeito dos inibidores de COX na quimiotaxia induzida por fMLP em câmara de Boyden

Inicialmente, foi necessária a padronização do modelo de quimiotaxia *in vitro* utilizando a câmara de Boyden. Com base em dados da literatura, foi realizada uma série de experimentos visando a obter padrões ótimos da concentração do agente quimiotático e da quantidade de células que seria colocada em cada poço da câmara. Padronizaram-se a dose de 10^{-6} M de fMLP e o número de $1,5 \times 10^6$ células por poço para estudos posteriores.

A quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo fMLP já é bem descrita na literatura. Como demonstra a Figura 15, há um aumento estatisticamente significativo da migração de neutrófilos quando são comparadas as células expostas ao fMLP com as que somente foram expostas ao meio de cultura.

Com base nesses dados, estudos dos efeitos dos inibidores de ciclooxigenases nesse modelo foram realizados.

A incubação dos leucócitos com celecoxibe diluído no meio de cultura (30 minutos antes da colocação das células na câmara, na faixa de doses 100-1000ng/mL) inibiu a quimiotaxia induzida pelo fMLP. O mesmo resultado foi obtido quando a incubação foi realizada com indometacina na dose de $2\mu\text{g/ml}$ (Figura 16).

Para verificarmos se o efeito inibitório observado anteriormente pelo celecoxibe quando injetado subcutaneamente é reproduzido nesse modelo, grupos de animais foram tratados com diferentes doses de celecoxibe

subcutaneamente 30 minutos antes da punção cardíaca para colheita do sangue e purificação dos polimorfonucleares. O restante do processamento foi exatamente igual para todos os grupos. Em comparação com os polimorfonucleares obtidos de animais injetados subcutaneamente com salina, o pré-tratamento dos animais com as mesmas doses de celecoxibe utilizadas nos estudos anteriores (12 e 30mg/Kg) causou inibição da quimiotaxia dos polimorfonucleares induzida por fMLP (Figura 15).

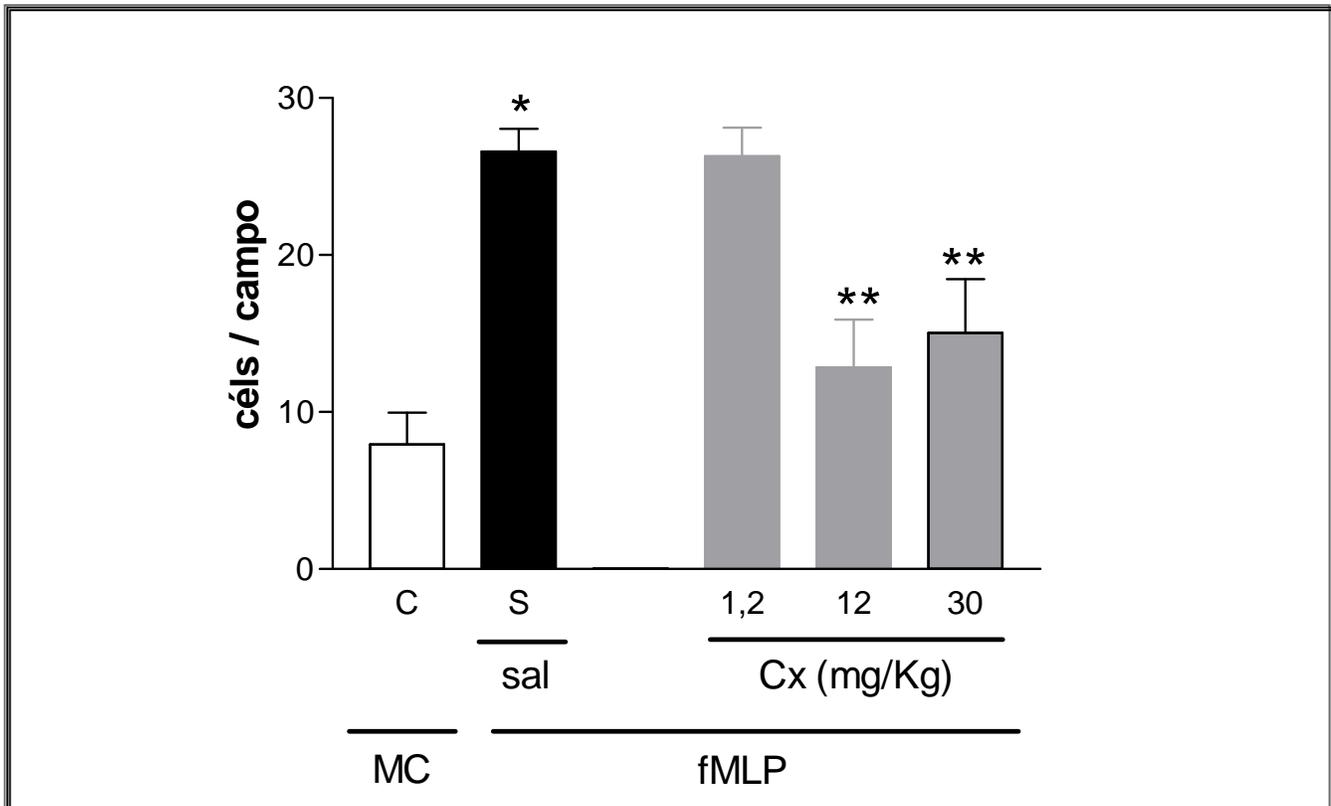


Figura 15 – Efeito do tratamento dos animais com celecoxibe previamente à punção cardíaca para coleta de sangue na migração de neutrófilos na câmara de Boyden – Os animais foram pré-tratados (meia hora antes) com celecoxibe (Cx) ou salina (S) antes de serem submetidos à punção cardíaca. O sangue coletado foi processado individualmente por grupos, de modo a se obter cerca de 95% de neutrófilos (viabilidade >90%). Células que não sofreram nenhuma incubação e nem exposição ao agente quimiotático também foram estudadas (C). * - indica diferença significativa em relação a grupo controle (C) e ** em relação ao grupo incubado somente com meio de cultura (MC). N=3-5.

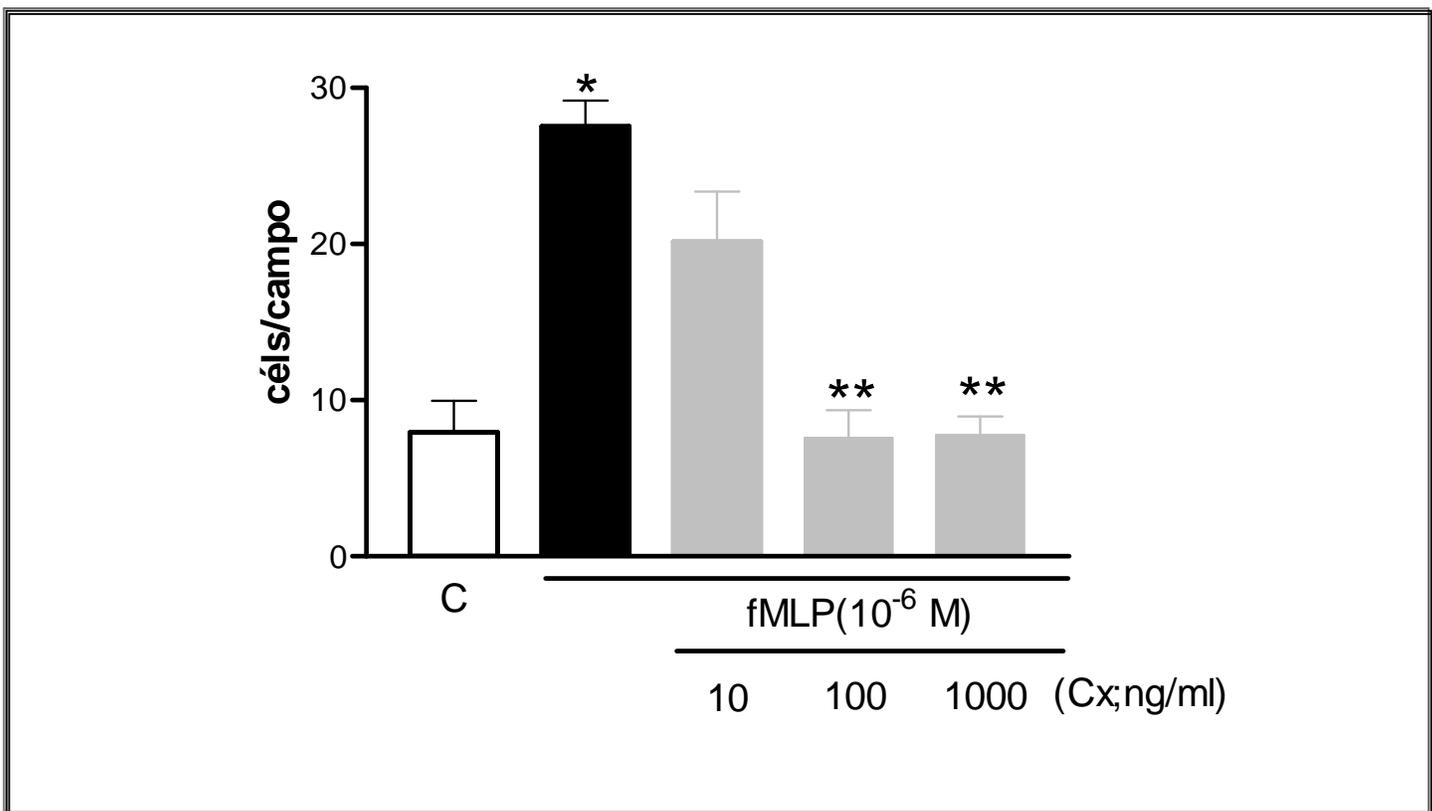


Figura 16 – Demonstração do efeito quimiotático do fMLP no modelo da câmara de Boyden – Efeito da incubação dos neutrófilos com doses crescentes de celecoxibe. Os animais foram submetidos à punção cardíaca e o sangue coletado foi processado de modo a se obter cerca de 95% de neutrófilos (viabilidade >90%). Trinta minutos antes de serem expostas ao agente quimiotático (fMLP), as células foram incubadas com celecoxibe (Cx, doses em ng/ml) ou somente com o meio de cultura (MC). Células que não sofreram nenhuma incubação e nem exposição ao agente quimiotático também foram estudadas (C). * - indica diferença significativa em relação a grupo controle (C) e ** em relação ao grupo incubado somente com meio de cultura (MC). N=5.

Estudo do efeito de inibidores de COX sobre os leucócitos na microcirculação do músculo cremáster.

Para certificarmos que a dose de LPS injetada na cavidade escrotal dos animais e de celecoxibe utilizadas estavam adequadas, uma curva dose-resposta ao celecoxibe foi confeccionada utilizando uma mesma dose de LPS (0,05 μ g/Kg, LIU *et al*, 2005) no modelo de migração leucocitária para a cavidade peritoneal de camundongos. O LPS foi capaz de induzir migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, que foi significativamente diferente do grupo controle. Interessantemente, o pré-tratamento dos animais com as doses de 12mg/Kg de celecoxibe inibiu significativamente a migração de leucócitos induzida pelo LPS (Figura 17).

A injeção intraescrotal (ie) de LPS na dose de 0,05 μ g/Kg (LIU *et al*, 2005) em comparação com os animais controle, é capaz de aumentar significativamente o número de leucócitos em rolamento, aderidos e migrados (6 horas após a injeção de LPS) na microcirculação do cremáster. Porém, não houve aumento do número de leucócitos circulantes após a injeção intraescrotal de LPS em comparação com os animais injetados com veículo.

Nesta perspectiva, estudamos os efeitos da indometacina, do celecoxibe e do SC 560 neste modelo experimental.

O pré-tratamento dos animais com o celecoxibe na dose de 12mg/Kg inibiu a migração de leucócitos induzida pela injeção intraescrotal de LPS, além de reduzir de maneira significativa o número de células em rolamento e

aderidas. No grupo que recebeu indometacina (2mg/Kg), embora não se tenha observado redução significativa no número de células em rolamento, houve redução na migração de leucócitos provavelmente devido a um menor número de células aderidas. Diferentemente, o pré-tratamento dos animais com o inibidor seletivo de COX-1 (SC560; 5mg/Kg) não apresentou redução de nenhum dos parâmetros avaliados em comparação com o grupo controle.

O aumento, embora não significativo, do número de leucócitos em rolamento nos animais pré-tratados com SC560 nos levou a estudar o efeito desta droga em animais não estimulados com LPS. Interessantemente, o pré-tratamento dos animais com esta droga provocou aumento no número de leucócitos em rolamento em comparação com os animais controle (Fig. 19).

A velocidade de rolamento foi similar e não foram notadas grandes diferenças nos padrões hemodinâmicos entre os grupos estudados. O estresse de cisalhamento do grupo tratado com SC560 foi significativamente maior em relação ao grupo controle, como apresentado na Tabela 2.

Finalizando, os músculos cremáster dos animais pertencentes aos grupos estudados foram retirados e fixados em formol 10%. Após isso, os tecidos foram processados e cortes histológicos foram feitos e corados por H&E. Como se pode observar na Prancha 1, os tecidos dos animais pertencentes aos grupos controle (SAL sc / SAL ie) e ao grupo dos que foram pré-tratados com celecoxibe (Cx sc /LPS ie) encontram-se em padrões de normalidade histopatológicas. Porém, os tecidos dos animais que receberam injeção de LPS intraescrotal e não receberam previamente celecoxibe (SAL sc /LPS ie)

apresentam um infiltrado inflamatório composto basicamente por neutrófilos, que se estende pelos tecidos perivasculares. Está apresentada também uma comparação entre os cortes histológicos e os *frames* dos vídeos da microscopia intravital dos mesmos grupos, onde se observa que grande parte das células que estavam sendo visualizadas nas imagens da microscopia intravital eram neutrófilos.

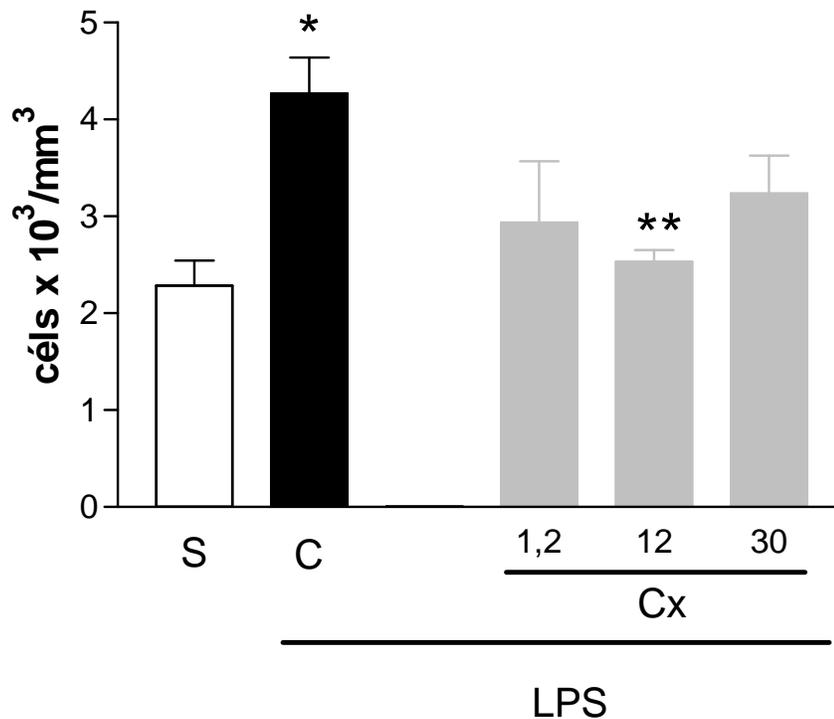


Figura 17 – Efeito do celecoxibe sobre a migração celular induzida por LPS administrado intraperitonealmente em camundongos. Os animais foram pré-tratados com celecoxibe (sc, meia hora antes, doses indicadas em mg/Kg) ou salina (C) e injetados intraperitonealmente com LPS (0,05 μ g/Kg) ou salina (S) no tempo zero. O lavado peritoneal foi coletado (em 3mL de PBS) e centrifugado. O número de células presentes no lavado peritoneal após 6 horas da injeção ip de LPS ou salina foi contado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz (aumento 400x). *- indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina (S) e ** - em relação ao grupo controle (C). N=3.

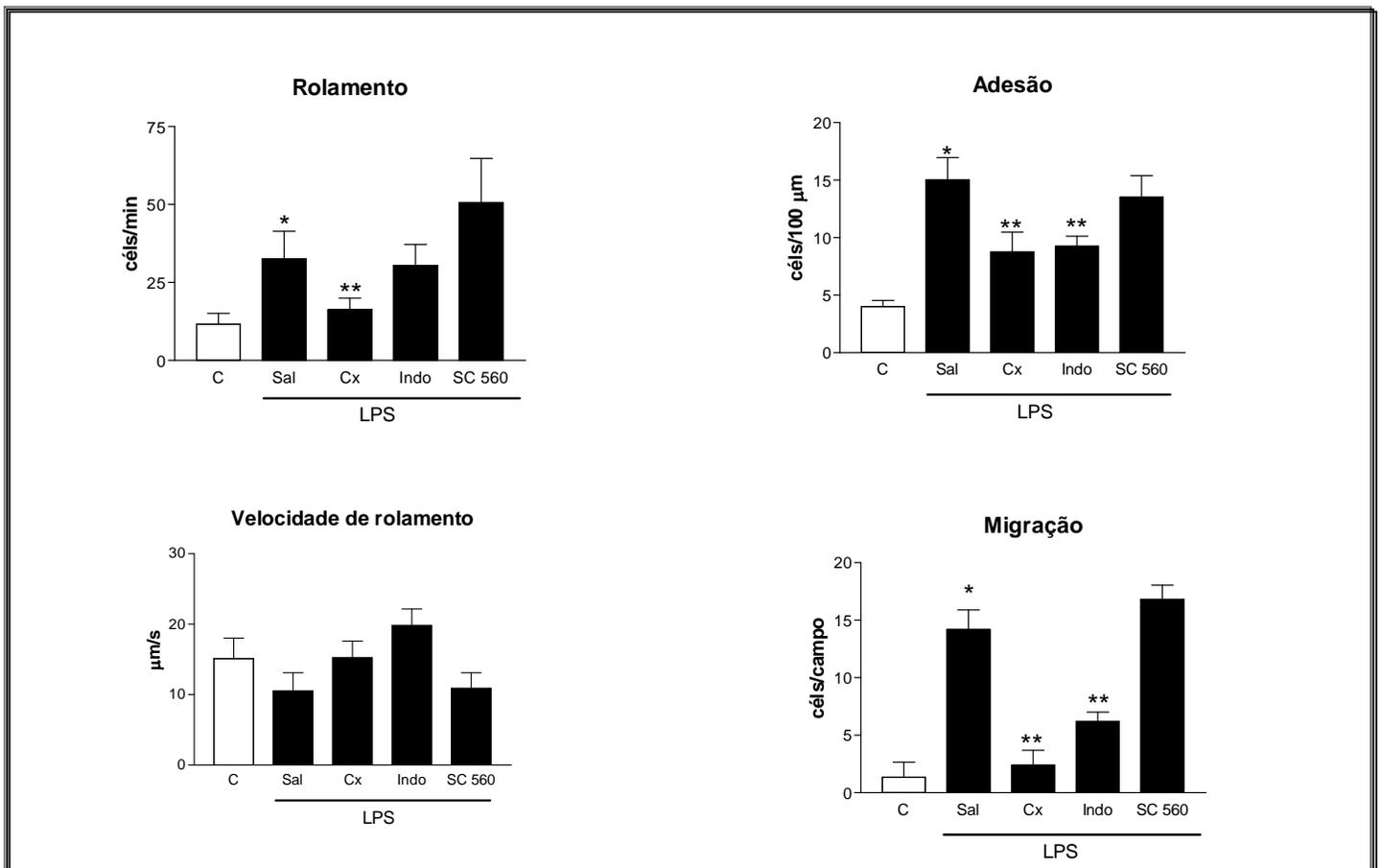


Figura 18 – Efeito dos inibidores de COX nas diferentes fases do recrutamento leucocitário para o músculo cremáster de camundongos. Os animais foram anestesiados e o músculo cremáster exposto para visualização e filmagem sob microscopia de luz. Os dados foram obtidos como descrito em Material e Métodos. A denominação dos grupos indica tratamento sistêmico (sc) e posterior injeção ie de LPS. * - indica diferença significativa em relação a grupo controle (C) e ** em relação ao grupo tratado com salina (Sal). N=5.

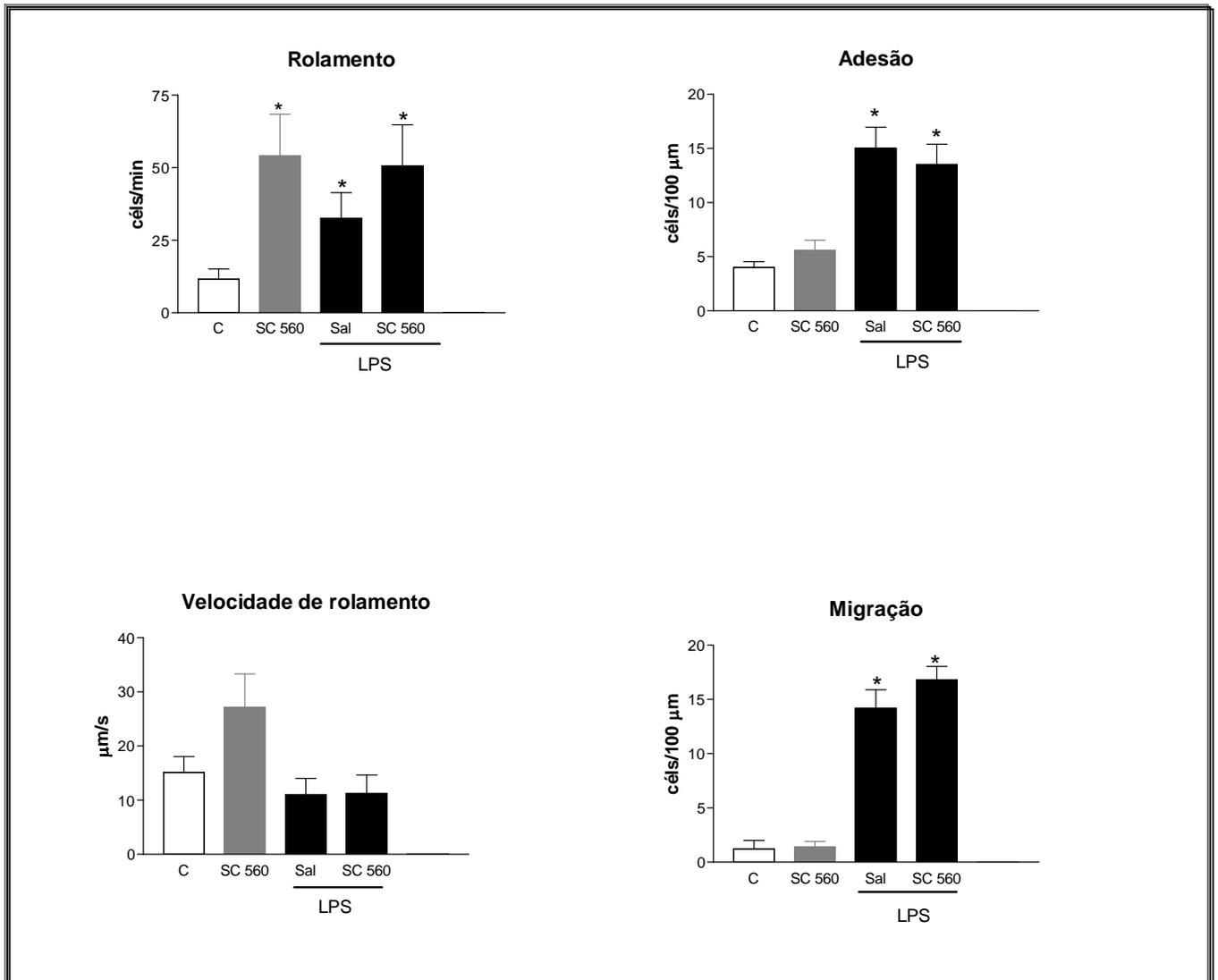
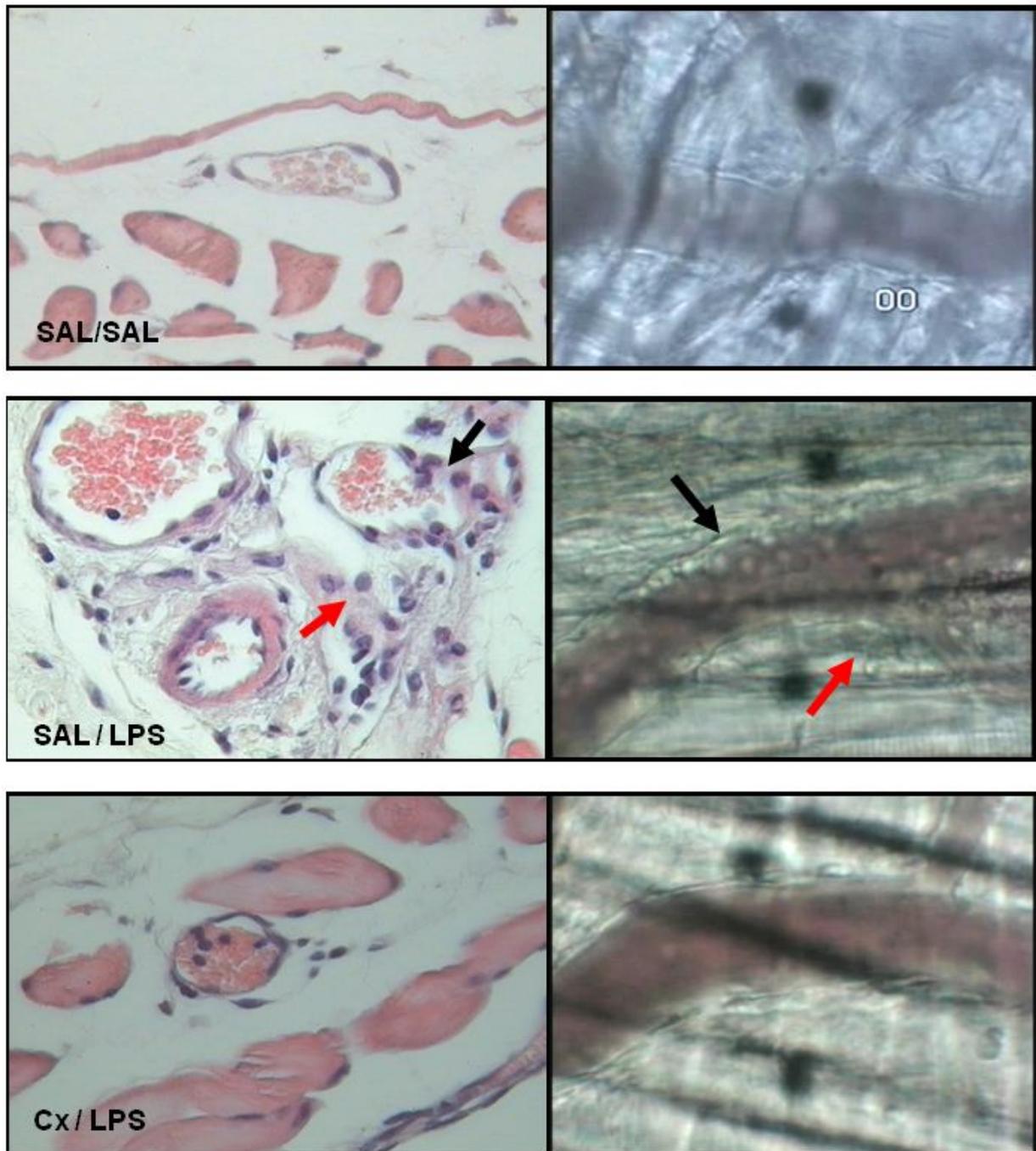


Figura 19 – Efeito do SC560 nas diferentes fases do recrutamento leucocitário para o músculo cremáster de camundongos. Os animais foram anestesiados e o músculo cremáster exposto para visualização e filmagem sob microscopia de luz. Os dados foram obtidos como descrito detalhadamente em Material e Métodos. A denominação dos grupos indica tratamento sistêmico (sc) com SC560 e posterior injeção ie de LPS (nos grupos indicados). * - indica diferença significativa em relação a grupo controle (C). N=5.

Tabela 2 - Parâmetros hemodinâmicos dos animais submetidos à microscopia intravital.

Grupo	C	LPS	CX	Indo	SC560
Diâmetro do vaso (μm)	46.8 \pm 6.6	44.8 \pm 8.47	39.9 \pm 5.4	41.8 \pm 3.4	40.7 \pm 9.4
Velocidade da hemácia (V_{mean} ; μ/s)	1.87 \pm 0.15	1.78 \pm 0.52	2.05 \pm 0.5	2.00 \pm 0.8	2.7 \pm 0.8
Estresse de cisalhamento (s^{-1})	0.33 \pm 0.06	0.62 \pm 0.12	0.61 \pm 0.08	0.51 \pm 0.07	0.81 \pm 0.08 *

*- indica diferença significativa em relação ao grupo controle.



Prancha 1 – Cortes histológicos do músculo cremaster corados por H&E (esquerda) e captura de *frame* das imagens da microscopia intravital (direita). Os nomes dos grupos se referem aos tratamentos realizados (subcutâneo/intraescrotal) descritos detalhadamente em Resultados. Sal = salina; Cx = celecoxibe. As setas pretas indicam presença de neutrófilos junto ao endotélio e as vermelhas indicam o acúmulo destas células nos espaços perivascularares.

5- DISCUSSÃO

O modelo de recrutamento de leucócitos induzido por LPS e o efeito de inibidores de COX

O modelo experimental de migração leucocitária para a cavidade peritoneal é bem descrito, de fácil reprodução e é considerado um ensaio padrão para expressão de COX-2 por células inflamatórias (GROSSMAM *et al*, 1995). Nossos dados confirmaram que a injeção intraperitoneal de LPS é capaz de induzir recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos, corroborando dados anteriores que demonstram que o LPS é um potente estímulo para a adesão e infiltração de neutrófilos (ALLCOCK *et al*, 2000).

A injeção de LPS na cavidade peritoneal parece ativar inicialmente neutrófilos, evento este que se mantém pelo menos até a 24^a hora. A participação de outros tipos celulares, principalmente macrófagos, em eventos agudos do processo inflamatório já é bem descrita. A população residente de macrófagos pode controlar o recrutamento de neutrófilos induzido por vários estímulos pró-inflamatórios, como carragenina, endotoxinas e zymosan, principalmente quando o número de macrófagos residentes está aumentado experimentalmente. Em contrapartida, quando essas células são retiradas da cavidade peritoneal, a migração de neutrófilos frente a estímulos inflamatórios é diminuída (SOUZA *et al*, 1988). Assim, embora os neutrófilos sejam as principais

células presentes no lavado peritoneal, os macrófagos parecem exercer um papel-chave na cinética de recrutamento de leucócitos.

A administração de LPS causou aumento no número de células presentes no lavado peritoneal, que pode ser atribuído principalmente à migração de neutrófilos e macrófagos. A migração de neutrófilos ocorre em estágios iniciais, estabilizando-se posteriormente com o aumento da dose de LPS, em que se observa então um aumento da migração de macrófagos. O aumento da dose de LPS para valores superiores a 3µg/sítio não refletiu em aumento no número de células na cavidade peritoneal. Esses dados sugerem que, em altas doses, o LPS injetado na cavidade peritoneal dos animais poderia atingir a circulação sistêmica, inibindo o recrutamento de células através da síntese de óxido nítrico (NO) por células inflamatórias, que atuaria sobre a polimerização do citoesqueleto, interferindo nos processos de migração leucocitária (TAVARES-MURTA *et al*, 2001; CLEMENTS *et al*, 2003). Há também evidências de que em situações de elevadas concentrações sistêmicas de LPS ocorre um rápido e seletivo acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar, sendo inclusive responsável pelas síndromes lesivas pulmonares agudas decorrentes de processos infecciosos e sepse (ABRAHAM *et al*, 2006; MATTHAY *et al*, 2003; ANDONEGUI *et al*, 2003).

Deste modo, demonstramos que sob nossas condições experimentais o modelo de migração leucocitária para a cavidade peritoneal de ratos reproduz dados previamente descritos, possibilitando assim estudos posteriores.

Participação de prostaglandinas no recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal de ratos

Há na literatura científica trabalhos demonstrando o papel de diversos mediadores no processo de quimiotaxia e migração de leucócitos. Leucotrieno B₄, fatores bacterianos, citocinas, quimiocinas, componentes do sistema do complemento e da cascata de coagulação (DELLINGER, 2003), dentre outros, já foram bem descritos como agentes que promovem migração leucocitária (MULLER, 2002).

A demonstração do envolvimento de prostaglandinas em eventos de migração leucocitária não é recente. DIAZ-PEREZ *et al* em 1976, demonstraram que dentre as diversas prostaglandinas estudadas, PGF_{2α} foi a única que potencializou o potencial quimiotático da caseína em um modelo *in vitro* de quimiotaxia.

No presente estudo, verificamos que a injeção intraperitoneal de PGF_{2α} induziu de maneira dose-dependente a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos, diferente do ocorrido com a PGE₂ onde tal efeito não foi observado (MENEZES *et al*, 2005). De fato, PGE₂ é descrita como supressor da resposta imunológica, embora seja um potente agente hiperalgésico (FERREIRA *et al*, 1973). Foi demonstrado ainda que a exposição de células decíduais e placentárias de ratos ao LPS causou aumento da liberação de PGF_{2α} (GU *et al*, 1994; ARNTZEN *et al*, 1999) e esse mediador foi capaz de causar aumento da

adesão e migração de leucócitos nesses modelos experimentais (MINEGISHI *et al*, 2002).

A partir de um estudo *in vitro*, ARNOULD *et al* (2001) demonstraram que $\text{PGF}_{2\alpha}$ poderia ser um agente quimiotático para neutrófilos. Em neutrófilos humanos isolados, esse prostanóide parece agir via receptores FP presentes nessas células, já que a quimiotaxia *in vitro* induzida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi inibida por um antagonista de tais receptores, o composto $\text{PGF}_{2\alpha}$ dimetil-amida. Embora dificuldades em se localizar receptores FP em neutrófilos de ratos tenham sido relatadas (WISE e JONES, 1994), recentemente foi descrito que esse prostanóide, juntamente com seu estereoisômero $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_{2\alpha}$, é um agonista para receptores quimiotáticos CRTH_2 (*chemoattractant receptor homologous molecule expressed by Th2 cells*), reforçando a hipótese de que $\text{PGF}_{2\alpha}$ possa exercer um papel importante na quimiotaxia de leucócitos (SANDIG *et al*, 2005).

Reforçando tais dados, o pré-tratamento dos animais com inibidores seletivos de COX-2 não inibiu o recrutamento leucocitário induzido por injeção direta de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dados não apresentados). Isso sugere que os efeitos observados com o tratamento com esses inibidores são devido à inibição da síntese de mediadores lipídicos. Demonstramos ainda que a reposição de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em animais pré-tratados com um inibidor seletivo de COX-2 e posteriormente injetado com LPS restabelece a migração outrora inibida (MENEZES *et al*, 2005). Esses dados, somados aos achados em estudos *in vitro* de quimiotaxia direta desse mediador (ARNOULD *et al*, 2001), sugerem que $\text{PGF}_{2\alpha}$ exerce um papel importante no recrutamento de leucócitos.

De fato, dosagens imunoenzimáticas da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lavado peritoneal sugerem que esse mediador é liberado nas etapas iniciais do processo inflamatório deflagrado na cavidade peritoneal pelo LPS. Do ponto de vista da cinética dos leucócitos para a cavidade peritoneal, uma rápida liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com atividade quimiotática seria importante para explicar a presença dos leucócitos observados em etapas subseqüentes da injeção da endotoxina bacteriana, a partir da 3ª hora, como observado nesse trabalho.

Efeito dos inibidores de ciclooxigenases (COXs) no recrutamento leucocitário *in vivo* e *in vitro*.

A indometacina, um antiinflamatório padrão, tem como mecanismo de ação a inibição de ambas isoformas de ciclooxigenases (VANE *et al*, 1998). A eficácia na redução da migração de leucócitos nos modelos *in vivo* e na quimiotaxia *in vitro* pode ser justificada principalmente pela sua atividade sobre COX-2, uma vez que o inibidor seletivo de COX-1 não exibiu efeito inibitório sobre a migração celular em nenhum modelo estudado.

O pré-tratamento dos animais com inibidores de COX-2 inibiu o recrutamento leucocitário induzido por LPS na 6ª hora, sendo o rofecoxibe (0,7mg/Kg) o composto que apresentou a maior potência. A ineficácia inibitória dessas drogas (celecoxibe e rofecoxibe) na 3ª hora, tanto no modelo envolvendo LPS quanto carragenina (dados não apresentados) pode ser explicada a partir de trabalhos que demonstraram que quantidades insuficientes de COX-2 são expressas

nesse tempo de inflamação (HLA & NEILSON, 1992). De fato, estudos têm demonstrado que a expressão de COX-2 aumenta após o início do processo inflamatório e atinge o pico de expressão do RNA mensageiro (RNAm) para essa enzima aproximadamente na 6^a hora após o estímulo inflamatório, sendo que o RNAm para COX-1 se mantém inalterado, no mínimo, até a 24^a hora (BEICHE *et al*, 1996). Esses dados sugerem que o recrutamento de leucócitos observado em tempos iniciais de inflamação (3 horas) é mediado, pelo menos em parte, por outros mediadores inflamatórios que possuem atividade independente da expressão de COX-2.

Os inibidores de COX-2 utilizados em nosso trabalho foram obtidos a partir de formulações comerciais, de modo que a administração do composto ativo era acompanhada dos respectivos excipientes. Estudamos o efeito de um composto experimental também inibidor de COX-2, porém livre de excipientes (SC 236), e verificamos que o efeito inibitório sobre o recrutamento de leucócitos foi também observado. Portanto, admite-se que os efeitos observados sejam de fato por ação do princípio ativo desses medicamentos.

A demonstração *in vitro* da eficácia do celecoxibe em inibir a migração de neutrófilos (câmara de Boyden) quando as células foram incubadas previamente ou mesmo quando os animais doadores de neutrófilos foram pré-tratados, reforça os dados previamente obtidos com o modelo de migração *in vivo*. A dose de 12mg/Kg parece ser adequada para estudos envolvendo efeitos antiinflamatórios dessa droga, tendo-se constituído uma dose-padrão inclusive para estudos em outros modelos de inflamação em nosso laboratório. O

celecoxibe, nesta dose, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a gengiva, diminuir a perda óssea e reduzir a atividade de mieloperoxidase em um modelo de periodontite experimental em ratos (QUEIROZ-JÚNIOR, 2008; *in press*). A ineficácia no que se refere à inibição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal observada com o aumento da dose sistêmica de celecoxibe para 30mg/Kg sugere que de fato o efeito dessa droga nessa dose possa afetar sistemas diferentes do leucocitário, uma vez que quando as células foram retiradas no animal doador para estudos *ex vivo* o pré-tratamento com essa dose de celecoxibe se mostrou eficaz na inibição da quimiotaxia promovida pelo fMLP.

Esses dados podem ainda ser analisados de maneira mais ampla com os resultados obtidos nos estudos de microscopia intravital. Mostramos que o celecoxibe interfere em todos os estágios do recrutamento leucocitário induzido por LPS, que abrange desde o rolamento até mesmo a transmigração destas células para os espaços perivasculares. Sendo assim, pode-se supor que tais efeitos derivem de uma modificação na expressão de moléculas de adesão, cruciais para os processos de migração de leucócitos. Estudos envolvendo o efeito do celecoxibe em modelos de artrite corroboram esses dados, demonstrando que a inibição da COX-2 por essa droga pode reduzir as interações entre leucócitos e endotélio e reduzir a expressão de moléculas de adesão (GEBHARD *et al*, 2005). De fato, parte dos efeitos antiinflamatórios representados pelos NSAIDs tem sido atribuída à ação dessas drogas através da inibição da expressão de L-selectina em neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (DÍAZ-

GONZÁLES *et al*, 1995), inibição da ativação de integrinas em leucócitos (GARCÍA-VICUÑA *et al*, 1997) e ainda inibição de E-selectina, I-CAM e V-CAM em outros modelos de estudo (SAKAI *et al*, 1996).

O aumento do número de células em rolamento nos animais tratados com SC560 não tratados com LPS é uma questão interessante. Prostaciclina é produzida constantemente pela célula endotelial principalmente via COX-1 em situações fisiológicas e por COX-2 em situações de estresse vascular (AREHART *et al*, 2007; LIOU *et al*, 2000). Esse mediador possui atividade anti-trombogênica e a perfusão de pacientes com esse mediador é capaz de reduzir os níveis de P-selectina em células endoteliais (SAKAMAKI *et al*, 2007, KOSEK-LANGENECKER *et al*, 2003). Em modelos experimentais, a redução nos níveis de prostaciclina e de óxido nítrico pode aumentar a transmigração de leucócitos por aumentar a expressão de P-selectina (ALVAREZ *et al*, 2001). Esses dados em conjunto nos permitem sugerir que o aumento do número de leucócitos em rolamento induzido pelo tratamento com o SC560 neste modelo pode ser devido à inibição da síntese de prostaciclina pela célula endotelial, aumentando assim os níveis de P-selectina. E ainda, é plausível sugerir que exista um tônus fisiológico inibitório sobre o rolamento de leucócitos promovido pela COX-1 e conseqüentemente de seu produto (PGI₂), assim como ocorre com o óxido nítrico (KUBES *et al*, 1991). Estudos envolvendo a dosagem do metabólito da prostaciclina (6-keto-PGF_{1α}), a utilização de anticorpos anti-P-selectina e determinação da expressão dessa selectina no endotélio sob tais condições

poderão fornecer dados importantes quanto ao papel regulador exercido pela COX-1, e conseqüentemente, de PGI₂ nesse sistema.

A reunião desses resultados sugere que a expressão de COX-2 é importante para o processo de migração leucocitária, principalmente de neutrófilos, em todos os modelos estudados neste trabalho. Ainda, a eficácia terapêutica dos inibidores de COX-2 pode ser justificada pela atividade em sistemas diferentes e complementares.

6- CONCLUSÕES

- I. Confirmou-se que a endotoxina bacteriana LPS é capaz de deflagrar um processo inflamatório quando administrada intraperitonealmente, de tal modo ser possível estudar a ação de drogas neste processo;
- II. $\text{PGF}_{2\alpha}$ é um agente capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, o que pode constituir um modelo útil para o estudo de drogas com atividade antiinflamatória;
- III. A injeção intraperitoneal de LPS parece promover a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ principalmente nos instantes iniciais do processo inflamatório;
- IV. A isoforma mais importante envolvida com o recrutamento leucocitário em condições de inflamação parece ser a COX-2, enquanto a COX-1 parece exercer um papel regulatório em condições fisiológicas;
- V. A inibição da migração leucocitária *in vivo* promovida pelo celecoxibe também pode ser reproduzida em um modelo *in vitro*, sendo este efeito observado tanto em cultura de células quanto em pré-tratamento de animais doadores com essa droga;
- VI. Os inibidores de COX-2 podem exercer efeitos antiinflamatórios por interferirem na síntese de prostaglandinas e interferirem ainda nas interações leucócito-endotélio.
- VII. Os dados obtidos nos modelos experimentais envolvendo camundongos podem ser comparados àqueles obtidos em ratos, já que ambos grupos responderam de maneira similar aos tratamentos com as mesmas drogas.

7 - REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E., NICK, J.A., AZAM, T., KIM, S.H., MIRA, J.P., SVETKAUSKAITE D., HE, Q., ZAMORA, M., MURPHY, J., PARK, J.S., OVERDIER, K., DINARELLO, C.A. Peripheral blood neutrophil activation patterns are associated with pulmonary inflammatory responses to lipopolysaccharide in humans. *J Immunol.* 2006 Jun 15;176(12):7753-60

ABRAMOVITZ, M., BOIE, Y., NGUYEN, T., RUSHMORE, T.H., BAYNE, M.A., METTERS, K.M., SLIPETZ, D.M., GRYGORCZYK, R. Cloning and Expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor *J Biolol Chem* 269(4) 2632-6 (1994)

AJUEBOR, M.N., DAS, A.M., VIRÁG,L.A., FLOWER, R.J., SZABÓ, C.E PERRETTI, M. Role of Resident Peritoneal Macrophages and Mast Cells in Chemokine Production and Neutrophil Migration in Acute Inflammation: Evidence for an Inhibitory Loop Involving Endogenous IL-10. *J. Immunol.*162:1685-1691. (1999)

AKDIS C.A. E BLASER, K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J. Allergy Clin.Immunol.* 112:15-21(2003)

ALLCOCK, G.H., ALLEGRA, R.J. FLOWER, R.J., PERRETTI, M. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. *Clin Exp Immunol* 123:62-67 (2001)

ALVAREZ, A., PIQUERAS, L., BELLO, R., CANET, A., MORENO, L., KUBES, P., SANZ, M.J. Angiotensin II is involved in nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Br J Pharmacol*. Feb;132(3):677-84 (2001)

ANDONEGUI, G., BONDER, C.S., GREEN, F., MULLALY, S.C., ZBYTNUIK, L., RAHARJO, E., KUBES, P.. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(7):1011-20. Erratum in: *J Clin Invest*. 2003 Oct;112(8):1264

AREHART, E., GLEIM, S., KASZA, Z., FETALVERO, K.M., MARTIN, K.A., HWA, J. Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease. *Curr Med Chem*. 2007;14(20):2161-9

ARIEL, A., SERHAN, C.N. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends in immunology*. 2007 Apr;28(4):176-83.

ARNOULD, T., THIBAUT-VERCRUYSSSEN, R., BOUAZIZ, N., DIEU, M, REMACLE, J. E MICHIELS, C. PGF_{2α}, a prostanoid released by endothelial cells

activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment
Am J Pathol 159:345-357 (2001)

ARNTZEN, K.J., EGEBERG, K., RAHIMIPOOR, S., VATTEN, L., AUSTGULEN, R. LPS mediated production of IL-1, PGE₂ and PGF_{2α} from term decidua involves tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor p55. Journal of Reproductive Immunology 45:113-125 (1999)

ARONOFF, D.M., NEILSON, E.G. Antipyretics: Mechanisms of action and clinical use in fever suppression Am J Med 111:304-315 (2001)

ARTHUS, M.C. Séanc Soc. Biology; 55:817(1903)

BAKHLE, Y.S & BOTTING, R.M. (1996). Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation, Mediat. Inflamm., 5, 305-323.

BALLOU, L.R., BOTTING, R.M., GOORHA, S., ZHANG, J., VANE, J.R. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. PNAS 97(18): 10272-6 (2000)

BEICHE, F., SCHEUERER, S, BRUNE, K., GEISSLINGER, G. E GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. FEBS Letters 390: 165-169 (1996)

BLAIRON, L., X. WITTEBOLE, AND P. F. LATERRE. Lipopolysaccharide-Binding Protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. *J. Infect. Dis.* 187:287–291. (2003)

BRITO, G.A.C., FALCÃO, J.L.A.A., SARAIVA, S.N.R., LIMA, A.A., FLORES, C.A.A. E RIBEIRO, R.A. Histopathological analysis of rat mesentery as a method for evaluating neutrophil migration: differential effects of dexamethasone and pertussis toxin. *Braz J Med Biol Res* 31:1319-1327 (1998)

CARA, D.C., KUBES, P. Intravital microscopy as a tool for studying recruitment and chemotaxis. *Methods Mol Biol.*;239:123-32. (2004)

CARROL, M.C. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology* 5 (10): 981-986 (2004)

CASTRO, M.S.A. and FERREIRA, S.H. Cell migration and Hyperalgesia: A paradoxical effect of endotoxin. *Advances in Inflammation Research* Vol. 1 (1979)

CHAN, C. C., BOYCE, S. & BRIDEAU, C. Rofecoxib (Vioxx, Mk-0966; 4-(4'-Methylsulfonylphenyl)-3-Phenyl-2(5h)-Furanone: A Potent And Orally Active cyclooxygenase inhibitor. *Pharmacological and Biochemical Profiles. J. Pharm. Exp. Ther.*,290, 551-560. (1999)

CLEMENTS, M.K., SIEMSEN, D.W., SWAIN, S.D. et al. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. *J Leukoc Biol.* 73(3):344-55 (2003)

DAVENPECK, K.L., STEEBER, D.A., TEDDER, T.F. et al. P- and L-selectin mediate distinct but overlapping functions in endotoxin-induced leukocyte-endothelial interactions in the rat mesenteric circulation. *J Immunol* 159:1977-86 (1997)

DELLINGER, R.P. Inflammation and Coagulation: Implications for septic patient. *Clinical Infection Diseases* . 36:1259-65 (2003)

DIAZ-GONZALEZ F, SANCHEZ-MADRID F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunology Today.* 1998 Apr;19(4):169-72.

DIAZ-PEREZ, JL, GOLDYNE, M,E,, WINKELMANN, R.K. Prostaglandins and chemotaxis: enhancement of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by prostaglandin F₂alpha. *J Invest Dermatol.* 1976 Mar;66(3):149-52.

DIULIO, C. , GIUSEPPE, A., PERIANNAN, K, DIPAULA, A., BECKER, L.C., ZWEIER, J.L. Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion

after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2649-H2657 (2001)

FERREIRA, S.H., MONCADA, S. E VANE, J.R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br J Pharmacol.* 49:86-97 (1973)

FITZGERALD, G.A. Coxibs and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 351;17 (2004)

FRANÇA, D.S., FERREIRA-ALVES, D.L., DUARTE, I.D., RIBEIRO, M.C., REZENDE, R.M., BAKHLE, Y.S., FRANCISCHI, J.N. Endogenous opioids mediate the hypoalgesia induced by selective inhibitors of cyclo-oxygenase 2 in rat paws treated with carrageenan. *Neuropharmacology.* Jul;51(1):37-43. Epub 2006 Apr 18. (2006)

FRANCISCHI, J.N., CHAVES, C.T.; MOURA, A.C.L.; LIMA, A.S.; FERREIRA-ALVES, D.L.; ROCHA, A.O. & BAKHLE, Y.S. – Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *British Journal of Pharmacology* 137(6): 837-844. (2002)

FRANCISCHI, J.N., CONROY, D.M., MAGHNI, K., SIROIS, P. Inhibition by rampamycin of leukocyte migration and bronchial hyperactivity induced by

injection of Sephadex beads to guineas-pigs. *Br J Pharmacol* 110:1381-1386 (1993)

FURIE, M.B. E GWENDALYN, J.R.. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol* 146:1287-1301(1995)

GARCÍA-VICUÑA R, DÍAZ-GONZÁLEZ F, GONZÁLEZ-ALVARO I, DEL POZO MA, MOLLINEDO F, CABAÑAS C, GONZÁLEZ-AMARO R, SÁNCHEZ-MADRID F. Prevention of cytokine-induced changes in leukocyte adhesion receptors by nonsteroidal antiinflammatory drugs from the oxicam family. *Arthritis Rheum.* 1997 Jan;40(1):143-53.

GEBHARD, H.H., ZYSK, S.P., SCHMITT-SODY, M., JANSSON, V., MESSMER, K., VEIHELMANN, A. The effects of Celecoxib on inflammation and synovial microcirculation in murine antigen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Jan-Feb;23(1):63-70.

GILROY, D.W., COLVILLE-NASH, P.R., WILLIS, D., CHIVERS, J., PAUL-CLARK, M.J., WILLOUGHBY, D.A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine.* 1999 Jun;5(6):698-701.

GROSSMAN, C.J., WISEMAN, J., LUCAS, F.S., TREVETHICK, M.A., BIRCH, P.J. Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human

platelets and mononuclear cells by NSAIDs and Cox 2 inhibitors. *Inflamm Res.* 1995 Jun;44(6):253-7. (1995)

GU, W, RICE, G.E., BRENNECKE, S.P. Effects of lyopolysaccharide on human placental prostaglandin F2alpha production in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 50(6): 311-5 (1994)

HAWKEY, C.J.. Cox-2 Inhibitors. *Lancet*, 353, 307-314. (1999)

HLA, T. E NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 7384-7388 (1992)

KARDOSH, A., SORIANO, N., LIU, Y.T., UDDIN, J., PETASIS, N.A., HOFMAN, F.M., CHEN, T.C., SCHÖNTHAL, A.H. Multitarget inhibition of drug-resistant multiple myeloma cell lines by dimethyl-celecoxib (DMC), a non-COX-2 inhibitory analog of celecoxib. *Blood*. Dec 15;106(13):4330-8. Epub 2005 Aug 25 (2005)

KELLY, M, HWANG, J.M., KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Jul;120(1):3-10. (2007)

KISMET, K., AKAY, M.T., ABBASOGLU, O. E., ERCAN, A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detect Prev.* 28(2):127-42. (2004)

KNAPP, S., VOS, A. F., FLORQUIN, S., GOLENBOCK, D.T. E POLL, T. Lipopolysaccharide Binding Protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. *Infect. Immun.* 71:6747-6753(2003)

KOZEK-LANGENECKER, S.A., SPISS, C.K., MICHALEK-SAUBERER, A., FELFERNIG, M., ZIMPFER, M. Effect of prostacyclin on platelets, polymorphonuclear cells, and heterotypic cell aggregation during hemofiltration. *Crit Care Med.* 2003 Mar;31(3):864-8.

KUBES, P., SUZUKI, M., GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 1;88(11):4651-5. (1991)

KUBES, P., HEIT, B., VAN MARLE, G., JOHNSTON, J.B., KNIGHT, D., KHAN, A., POWER, C. In vivo impairment of neutrophil recruitment during lentivirus infection. *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4801-8

KUJUBU, D.A., FLETCHER, B.S., VARNUM, B.C., LIM, R.W., HERSCHMAN, H.R.. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:2866–12872. (1991)

LIOU J.Y., DENG, W.G., GILROY, D.W., SHYUE, S.K., WU, K.K. Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34975-82.

LIU, L., CARA, D.C., KAUR, J., RAHARJO, E., MULLALY, S.C., JONGSTRA-BILEN, J., JONGSTRA, J., KUBES, P. LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration. *J Exp Med*. 2005 Feb 7;201(3):409-18. Epub 2005 Jan 31.

LUKACS, N.W., STRIETER, R.M., CHENSUE, S.W., WIDMER, M. E KUNKEL, S.L. TNF- α mediates recruitment of neutrophils during airway inflammation. *J Immunol*. May 15;154(10):5411-7. (1995)

MARCHESI, V.T. (1961). The site of leukocyte emigration during inflammation. *J Exp Physiol Cogn Med Sci* 46:115–118.

MALTOS, K.L., MENEZES, G.B., CALIARI, M.V., ROCHA, O.A., SANTOS, J.M., ALVES, D.L., DUARTE I.D., FRANCISCHI, J.N. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch Oral Biol.* Jun;49(6):443-50. (2004).

MATTHAY, M.A, ZIMMERMAN, G.A., ESMON, C., BHATTACHARYA, J., COLLER, B., DOERSCHUK, C.M., FLOROS, J., GIMBRONE, M.A. JR, HOFFMAN, E., HUBMAYR, R.D., LEPPERT, M., MATALON, S., MUNFORD, R., PARSONS, P., SLUTSKY, A.S., TRACEY, K.J., WARD, P., GAIL, D.B., HARABIN, A.L. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med.* Apr 1;167(7):1027-35 (2003)

MIYAMOTO, K., MIYAKE, S., MIZUNO, M., OKA, N., KUSUNOKI, S., MAMURA T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. *Brain.* Aug;129 (Pt 8):1984-92. Epub 2006 Jul 10 (2006)

MENDONÇA, M.A, CUNHA, F.Q, MURTA, E.F., TAVARES-MURTA, B.M. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 2006 May;57(5):663-70.

MENEZES, G.B., MALTOS, K.L.M., SANTOS, J.M.M., DUARTE, I.D.G., FRANCISCHI, J.N. Cyclooxygenase (COX)-2 isoform accounts for neutrophil migration in a model of leukocyte recruitment induced by bacterial lipopolysaccharide in rats. *Inflam Res* 52(Suppl 2):88. (2003)

MENEZES, G.B., REIS, W.G., SANTOS, J.M.M., DUARTE, I.G.D e FRANCISCHI, J.N. Inhibition of Prostaglandin F_{2α} by Selective Cyclooxygenase 2 Inhibitors Accounts for Reduced Rat Leukocyte Migration. *Inflammation* Dec;29(4-6):163-9 (2005)

MERCK. Merck announces voluntary worldwide withdrawal of VIOXX®. Disponível em :www.vioxx.com/vioxx/document/english/vioxx_press_release.pdf (acessado em 30 de setembro de 2004).

MINEGISHI, K., TANAKA, M., NISHIMURA, O., TANIGAKI, S., MIYAKOSHI, K., ISHIMOTO, H., YOSHIMURA, Y. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis in rats *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1308-E1315 (2002)

MITCHEL, J.A. and EVANS, T.W. Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm. Res. Supl* 2, S88-S92. (1998)

MULLER, W.A.. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab. Invest.* 82:521-532(2002)

OLIVEIRA, S.H., FACCIOLI, L.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996 Nov;111(3):244-52(1996

PHILLIPSON, M., HEIT, B., COLARUSSO, P., LIU, L., BALLANTYNE, C.M., KUBES ,P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of Experimental Medicine.* Nov 27;203(12):2569-75. (2006)

ROTH, G.J. and MAJERUS, P.W. The mechanism of the effect of Aspirin on human platelets: 1 activation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56:624-32 (1975)

SAKAI, A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life Sci* May 24;58(26):2377-87. (1996)

SANDIG, H., ANDREW, D., BARNES, A.A., SABROE, I., PEASE, J. 9alpha,11beta-PGF2 and its stereoisomer PGF2alpha are novel agonists of the chemoattractant receptor, CRTH2. *FEBS Lett.* Jan 23;580(2):373-9. Epub 2005 Dec 13 (2006).

SANTOS, J.M.M., TATSUO, M.A., TURCHETTI-MAIA, R.M., LISBOA, M.C., FRANCISCHI, J.N. Leukocyte recruitment to peritoneal cavity of rats following formalin injection: role of tachykinin receptors. *J Pharmacol Sci* (4):384-92. (2004)

SAKAMAKI, F., KYOTANI, S., NAGAYA, N., SATO, N., OYA, H., SATOH, T., NAKANISHI, N. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation*. 2000 Nov 28;102(22):2720-5. Erratum in: *Circulation* 2001 Feb 6;103(5):779

SCHULIGOI, R., AMANN, R., PRENN, C. E PESKAR, B.A. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on thromboxane and leukotriene synthesis in rat peritoneal cells. *Inflamm. Res.* 47:227-230(1998)

SERHAN CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology*. 2007;25:101-37.

SHAFFER, A.F., TALLEY, J.J., MASFERRER J., SEIBERT K.E ISAKSON, P.. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 13313-13318. (1998)

SIMMONS, D.L. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine
Thrombosis Research 110:265-268 (2003)

SMITH, J.M., ZHANG, Y., KOBOLDT, C.M., MUHAMMAD, J., ZWEIFEL, B.S.,
SHAFFER, A.F., TALLEY, J.J., MASFERRER J., SEIBERT K., ISAKSON, P.
Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A., 95, 13313-13318. (1998).

SOUZA, G.E. , CUNHA, F.Q., MELLO, R., FERREIRA, S.H. Neutrophil
migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion.
Agents Actions. 1988 Jul;24(3-4):377-80.

SPICER, B.A., LAYCOCK, S.M., E SMITH, H.. The effects of drugs on leukocyte
changes following the injections of antigen into the peritoneal cavities of actively
sensitized rats. Agents and Actions 17:499-505(1985)

TAILOR, A., FLOWER, R.J., PERRETI, M. Dexametasone inhibits leukocyte
emigration in rat mesenteric post-capillary venules: an intravital microscopy
study. J Leuk Biol 62:301-8 (1997)

TAKANO, T., FIORE, S., MADDOX, J.F., BRADY, H.R., PETASIS, N.A., SERHAN, C.N. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997 May 5;185(9):1693-704.

TAVARES-MURTA, B.M., MACHADO, J.S. et al Nitric Oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS *Inflammation* (25) 4:247-253

TOPLEY, N., LIBEREK, T., DAVENPORT, A., LI, F.K., FEAR, H. E WILLIAMS, J.D. Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity *Kidney Int Suppl*. 56:S17-21. (1996)

TOPOL, E.J. Failing the public Health – Rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med* 351;17 (2004)

ULBRICH H, SOEHNLEIN O, XIE X, ERIKSSON EE, LINDBOM L, ALBRECHT W. Licofelone, a novel 5-LOX/COX-inhibitor, attenuates leukocyte rolling and adhesion on endothelium under flow. *Biochemical pharmacology*. Jul 1;70(1):30-6. 2005

VANE, J.R, BOTTING, R.M. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research* 110:255-258 (2003)

VANE, J.R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,96, 7563-7568. (1999).

VANE, J.R., BAKHLE, Y.S., BOTTING, R.M.. Cyclooxygenases1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38:97-120(1998)

VANE, J.R.. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin- like drugs. *Nature*, 231, 232-235. (1971)

VILLEGAS, I., LA CASA, C., DE LA LASTRA, C.A. MOTILVA, V., HERRERÍAS, J.M., MARTÍN, M.J. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandin and inflammatory response. *Life Sciences* 74:873-884.

VIOLA, A., LUSTER, A.D. Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Sep 17 (2007).

WARNER, T.D., VOJNOVIC, I., GIULIANO, F., JIMÉNEZ, R. BISHOP-BAILEY, D., MITCHELL, J.A. Cyclooxygenases 1,2, and 3 and the production of prostaglandin I₂: Investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective inhibitors in rat tissues. JPET 310:642-647 (2004)

WEDMORE, C.V. E WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature 19;289(5799):646-50. (1981)

WIND, P., NORKLINGER, B., ROGER, V., KAHLIL, A., GUIN, E., PARC, R. Long-term prognostic value of positive peritoneal washing in the colon cancer. Scand J Gastroenterol 34(6):606-10 (1999)

WISE, H., JONES, R.L. Characterization of prostanoid receptors on rat neutrophils. Br J Pharmacol 113(2): 581-7 (1994)

WILLOUGHBY DA, MOORE AR, COLVILLE-NASH PR, GILROY, D. Resolution of Inflammation. Int J Immunopharmacol. Dec;22(12):1131-5. (2000)

YAMAGATA, K., ANDREASSON, K.I., KAUFMANN, W.E., BARNES, C.A.E, WORLEY, P.F Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain

neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386 (1993)

YAMANE, H., SUGIMOTO, Y., TANAKA, S. E ICHIKAWA, A. Prostaglandin E2 receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF- α and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 11;278(1):224-8 (2000).

XIE, W.L., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D.L., ERIKSON, R.L., SIMMONS, D.L.. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2692–2696. (1991)

8- Anexos

Soluções utilizadas nesse trabalho:

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

Na ₂ HPO ₄	0,575g
KH ₂ PO ₄	0,130g
NaCL	4,100g
KCl	0,100g
Água destilada	q.s.p 500mL

Solução de Turk

Para 100 mL de solução:

100mg de violeta genciana

30 mL de ácido acético glacial

70 mL de água destilada

Solução de May-Grumwald e Giemsa

Solução de May-Grunwald

0,2% de azul de metileno em álcool metílico puro

Solução de Giemsa

0,3g de Giemsa em pó

25 mL de glicerina

25 mL de álcool metílico puro

Adicionar uma gota para cada 1 mL de água destilada.

Solução para lise de hemácias

Cloreto de amônio (0,16 M)	8,6 g/litro
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (0,17 M)	20,6 g/litro

Salina tamponada por bicarbonato (irrigação em MIV)

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1 mM
Glicose	1 mM
HEPES Ca ²⁺	10 mM
pH	7.2

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)