**ESTUDO COMPARATIVO DO MECANISMO DE AÇÃO E DOS
EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO TENOXICAM, INDOMETACINA,
DEXAMETASONA E METOTREXATO NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
AGUDO E CRÔNICO**

Antônio Beltrão Schütz

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor
em Patologia Bucal.

Prof. Orientador: Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU - FOB**

**BAURU
1996**

+ 961

045966

- 12/19/99

SCHUTZ, Antonio Beltrão

Sc94e Estudo comparativo do mecanismo de ação e dos efeitos farmacológicos do tenoxicam, indometacina, dexametazona e metotrexato no processo inflamatório agudo e crônico/Antonio Beltrão Schütz - Bauru, 1996.

209p. :il. ; 28cm

Tese. (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr.Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães

DEDALUS - Acervo - FOB

11600002966

DADOS CURRICULARES
ANTONIO BELTRÃO SCHÜTZ

10 de abril de 1960 Santa Maria - RS	Nascimento
1974	Conclusão na escola pública de primeiro grau Instituto de Educação Olavo Bilac.
1977	Conclusão do segundo grau no Colégio Estadual Profa. Maria Rocha.
1981	Bolsista na especialidade de farmácia HUSM /UFSM.
1982	Agente de Serviços Complementares na especialidade de Farmácia HUSM/UFSM.
1984	Monitor de Ensino de Patologia Bucal do Departamento de Patologia UFSM.
1985	Curso de Farmácia - UFSM.
1986	Curso de Odontologia - UFSM .
1987	Técnico em Farmácia - UFSM.
1990	Cirurgião-Dentista COPLACOM /UFSM
1992	Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio De Janeiro
1996	Curso de Doutorado em Patologia Bucal F.O.B. - USP.

"DEDICATÓRIA"

"Dedico este trabalho aos meus ex-professores dos Cursos de Pós-Graduação em Patologia Bucal da FO-UFRJ e da FOB-USP, em especial aos mestres Abel Silveira Cardoso, Renato Klover Pinto Lopez de Sampaio, José Carlos Borges Teles e ao orientador Prof. Dr. Sérgio Augusto Catanzaro Guimarães; a minha querida filha Paola e a cara esposa Valkíria, por compreender a ausência durante a sua realização".

"REFLEXÕES"

O dentista é o médico da boca, porém, para entender os mecanismos fisiopatológicos das afecções bucais deve estudar bioquímica como o farmacêutico.

O sonho assim como o experimento não acabou, pois renascerão com o surgimento de novos loucos e neles recairá a responsabilidade de pô-los em prática.

Na realização de um trabalho, o tempo e o esforço pessoal têm pouca importância, o que realmente interessa é a qualidade do produto final.

Considerando que a universidade é uma grande família, será que um de seus males não é a hereditariedade?

O corporativismo acadêmico é um câncer que gera metástases e, quando não mata, causa seqüelas. Portanto, cabe aos loucos extirpá-lo.

"AGRADECIMENTOS"

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao CNPq pelo de recurso financeiro (Proc. 507076/91-7) fornecido ao Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro-Gulmarães sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Coordenaria de Aperfeiçoamento do Pessoal Docente (CAPES) pelo apoio financeiro, possibilitando-me condições de frequentar os Cursos de Mestrado e Doutorado em Patologia Bucal.

Aos Professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, em particular ao caríssimo Prof. Dr. Alberto Consolaro, um dos maiores educadores do nosso país, exemplo raro de sapiência, pelo convívio salutar e enriquecedor.

Aos alunos, professores e funcionários das escolas municipais e estaduais da cidade de Bauru-SP, pelo carinho e presteza me dedicados, tornando menos árdua a coleta da placa microbiana dental, indispensável à realização deste estudo.

A minha avó Juracy de Souza Beltrão, portadora de artrite reumatóide, que, voluntariamente, ao se submeter ao tratamento com o tenoxicam prestou importantes

informações a respeito dos seus efeitos farmacológicos, confirmando alguns dos nossos resultados.

Aos colegas Pós-graduados antecessores na linha de pesquisa sobre a atividade secretora dos macrófagos, pelos trabalhos realizados, os quais me proporcionaram conhecimentos teóricos que serviram de base para a realização do presente estudo.

Aos professores regentes da Disciplina de Histologia da F.O.B./USP Drs. Antonio Marconi Stipp, Raulo Taga e ao colega Gerson Francisco de Assis França, pelos ensinamentos aplicados no estudo histomorfométrico realizado no presente trabalho.

Ao Professor Dr. Sérgio Augusto Catanzaro-Guimarães pela orientação - quando solicitada - sempre prestativa e segura.

SUMÁRIO

	páginas
Lista de Tabelas	ix
Lista de gráficos	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	16
2.1. Atividade secretora dos macrófagos e as lesões granulomatosas	16
2.2. Atividade secretora dos macrófagos e o metabolismo ósseo	38
3. Proposição	59
4. Materiais e Métodos	61
4.1. Efeito antiinflamatório agudo	62
4.1.1. Preparo dos agentes flogógenos	63
4.1.1.1. Preparo da placa microblana dental	63
4.1.1.2. Preparo da suspensão de carragenina	64
4.1.1.3. Preparo da solução de paracoccioidina	64
4.2. Efeito antiinflamatório crônico	66
4.2.1. Determinação do peso úmido	66
4.2.2. Determinação do peso seco	67
4.2.3. Determinação do peso diferencial	67
4.2.4. Determinação da densidade de volume do granuloma	67
4.2.4.1. Determinação da área do retículo	68
4.2.4.2. Cálculo do volume da estrutura	69
4.3. Tratamento estatístico	69
5. Resultados	74
6. Discussão	120
7. Conclusões	174
8. Referências bibliográficas	186
9. Abstract	209

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Páginas
Tabela 1 - Concentração do corante azul de Evans presente no foco inflamatório induzido pela Placa microbiana dental	99
Tabela 2 - Efeito antiinflamatório agudo da indometacina nas concentrações de 75 e 100 mg nos modelos induzidos pela carragenina e placa microbiana dental	99
Tabela 3 - Concentração do corante azul de Evans presente no foco inflamatório induzido pela Placa microbiana dental, carragenina e paracoccidiodina	100
Tabela 4 - Percentual de formação e inibição do exsudato inflamatorio pelos fármacos testados	101
Tabela 5 - Efeito dos fármacos testados no peso úmido, seco e diferencial dos granulomas induzidos pela PMD.	102
Tabela 6 - Avaliação morfométrica da densidade de volume das fibras colágenas, macrófagos (NM/F), tecido granulomatoso e região central de necrose dos granulomas	103
Tabela 7 - Teste de Friedman e das comparações múltiplas objetivando constatar diferenças significativas entre os grupos por período experimental.	104
Tabela 8 - Teste de Friedman e das comparações múltiplas objetivando verificar diferenças significativas entre os grupos em função do tempo	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos	Páginas
Gráfico I - Concentração do corante Azul de Evans presente no foco inflamatório agudo induzido pela placa microbiana dental em diferentes concentrações	108
Gráfico II - Percentual de inibição do Exsudato inflamatório agudo proporcionado pela indometacina nas concentrações de 75 e 100 mg no modelo induzido pela carragenina	108
Gráfico III - Percentual de inibição do exsudato inflamatório agudo pela indometacina nas concentrações de 75 e 100 mg no modelo induzido pela placa microbiana dental	109
Gráfico IV - Percentual de inibição do exsudato inflamatório agudo pelos fármacos testados, no modelo induzido pela carragenina	109
Gráfico V - Percentual de inibição do exsudato inflamatório agudo pelos fármacos testados, no modelo induzido pela placa microbiana dental	110
Gráfico VI - Percentual de inibição do exsudato inflamatório agudo pelos fármacos testados, no modelo induzido pela paracoccidioidina	110
Gráfico VII - Demonstrativo do peso úmido dos granulomas	111
Gráfico VIII - Percentual de inibição do peso úmido dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental	111
Gráfico IX - Demonstrativo do peso seco dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental	112
Gráfico X - Percentual de inibição do peso seco apresentado pelos fármacos	112
Gráfico XI - Demonstrativo do peso diferencial dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental	113
Gráfico XII - Percentual de inibição do peso diferencial dos granulomas	113
Gráfico XIII - Densidade de volume ocupada pelas fibras colágenas	114
Gráfico XIV - Densidade de volume ocupada pelos macrófagos	114

Gráfico XV - Densidade de volume ocupado pelo tecido granulomatoso	115
Gráfico XVI - Densidade de volume ocupada pela região central	115
Gráfico XVII - Percentual de inibição da densidade de volume das fibras colágenas pelos fármacos testados	116
Gráfico XVIII - Percentual de inibição da densidade de volume ocupado pelos macrófagos (NM/F) pelos fármacos testados	116
Gráfico XIX - Percentual de inibição da densidade de volume ocupado pelo tecido granulomatoso pelos fármacos testados	117
Gráfico XX - Percentual de inibição de volume da região central de necrose pelos fármacos testados	117
Gráfico XXI - Percentual de aumento da densidade de volume ocupada pelo tecido granulomatoso pelos fármacos testados	118
Gráfico XXII - Percentual de aumento da densidade do volume ocupada pela região central do granuloma pelos fármacos testados	118
Gráfico XXIII - Percentual de estimulação da densidade de volume ocupada pelas fibras colágenas no granuloma pelos fármacos testados	119

LISTA DE ABREVIATURAS

- IL-1 α - Interleucina 1 alfa
- TNF- α - Fator necrótico tumoral
- TGF α - Fator transformador do crescimento alfa
- TGF β - Fator transformador crescimento beta
- PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas
- FGF - Fator do crescimento fibroblástico
- EGF - Fator do crescimento epidérmico
- PGs - Prostaglandinas
- LTs - Leucotrienos
- LTB₄ - Leucotrieno B₄
- PGE₂ - Prostaglandina E₂
- n - Número de carbonos
- B.C.G. - Bacilo Calmette-Guérin
- INF- α - Interferon α
- C_{3b} - Fragmento 3b do sistema complemento
- AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico
- GMPc - Guanilato de adenosina cíclico
- IL 1 β - Interleucina 1 beta
- GM-CSF - Fator estimulador de colônia macrofágico granulocítico
- MIP-1 α - Proteína inflamatória macrofágica
- CD11b - Integrina
- CD18 - Integrina
- C_{5a} - Fragmento 5a do sistema complemento

- C_{5b67}** - Componente do complemento
FCγR - Receptor para a porção FC da imunoglobulina
IgG - Imunoglobulina G
CINC - Fator quimiotático para neutrófilos de ratos
ICAM-1 - Molécula de adesão celular
Selectina-E - Molécula de adesão celular
TBX₂ - Tromboxana
TIMP - Inibidor protéico das metaloproteinases
EGF - Fator de crescimento epidérmico
C-fos - Proto-oncogene
C-jun - Proto-oncogene
ONs - Enzima óxido nítrico sintetase
fMLP - Metionil-leucil-fenilalanina
RNA_m - RNA mensageiro
ELAM-1 - Molécula de adesão celular
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
IgM - Imunoglobulina G
IgE - Imunoglobulina E
MTX - Metotrexato
NK - Células matadoras naturais
PF₄ - Fator 4 plaquetário
C_{3a} - Componente 3a do complemento
C_{5a} - Componente 5a do complemento
Fator XII - Fator Hageman
hFpB - Fibrinopeptídeo B

- PAF - Fator ativador plaquetário
- PGI₂ - Prostaciclina
- IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
- DNA - Ácido desoxiribonucleico
- HLA - Antígeno maior do complexo de histocompatibilidade principal
- CSFs - Fatores estimuladores de colônia
- DIFs - Fatores estimuladores da diferenciação
- M-CSF - Fator estimulador da colônia dos macrófagos
- G-CSF - Fator estimulador da colônia granulocítico
- Eos-CSF - Fator estimulador de colônia eosinofílico
- Bas-CFC - Fator estimulador de colônia dos basófilos
- CFU-e - Fator estimulador dos eritrócitos
- Meg-CFC - Fator estimulador dos megacariócitos
- BFU-E - Fator estimulador de colônia das células eritróides
- DIA - Atividade inibidora da diferenciação
- LIF - Fator inibidor da leucemia
- PTH - Hormônio paratireoideano
- PTHrP - Peptídeo semelhante ao hormônio paratireoideano
- RER - Retículo endoplasmático rugoso
- DMD - Placa microbiana dental
- CG - Carragenina
- PCD - Paracoccidioidina
- AICAR - Aminoimidazole carboxamidoribonucleotídeo transformilase
- NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

COA - coenzima a

5 HPETE - Ácido hidroperoxileicosatetraenóico

ETs - Endotelinas

ET-1 - Endotelina 1

ET-2 - Endotelina 2

ET-3 - Endotelina 3

ETA - Receptor para endotelina A

ETB - Receptor para endotelina B

ETC - Receptor para endotelina C

IP₃ - Inositol trifosfato

(PAI) - Ativador do plasminogênio

(PAI) - Inibidor do plasminogênio

BH₄ - Tetrahidrobiopterina

NADPH - Nicotinamina dinucleotídeo fosfato reduzido

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

FNM - Flavina mononucleotídeo

NG - Nitroglicerina

PO₂ - Pressão do oxigênio

ATPase- Enzima adenosina trifosfatase

EDCF - Fator de contração derivado do endotélio

[Ca⁺²] - Concentração do íon cálcio

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

LTE₄ - Leucotrieno E₄

PECAM-1 - Molécula de adesão endotelial plaquetária

IAP-CD47- Proteína associada a integrina

1,25(OH)₂D₃ - Vitamina D3

ECM - Matriz extracelular subendotelial

LAF-3 - Antígeno 3 associado a função dos linfócitos

CD44 - Molécula de adesão

NAIDS - Antiinflamatórios não esteróides

RESUMO

Aprofundamos o estudo dos efeitos farmacológicos da dexametasona, indometacina e tenoxicam e de uma droga citostática (metotrexato), assim como a análise dos mecanismos envolvidos na estimulação flogógena causada por agentes de intensidades fraca, média e forte. Para isso, empregamos o teste edemogênico, que demonstrou ser os fármacos antiinflamatórios não esteróides (tenoxicam e indometacina), os de maior potência na inibição da exsudação plasmática induzida pela paracocclidioidina. Todavia, com agentes flogógenos de intensidade média (carragenina), o metotrexato foi o medicamento mais potente, enquanto que com a placa microbiana dental (agente forte), a dexametasona e a indometacina foram os de maior potência antiinflamatória. Por meio da análise histomorfométrica relativa dos granulomas induzidos por esse último agente, verificamos até 14 dias, a maior potência antiinflamatória apresentada pelo tenoxicam, comparativamente a indometacina, pois inibiu mais acentuadamente a região central de necrose supurativa, demonstrando efeito semelhante ao da dexametasona, não obstante, em relação à inibição da densidade do volume do tecido granulomatoso, os fármacos mais potentes terem sido a indometacina e a dexametasona. Após os 14 dias não foi constatada diferença significativa entre o efeito apresentado pelo tenoxicam e o da indometacina. O acentuado efeito apresentado pelos NSAIDs em relação à inibição da densidade de volume dos macrófagos, semelhante ao efeito do metotrexato, sugeriu que os NSAIDs inibiram a proliferação das células progenitoras mielóides dos monócitos/macrófagos. Também agiram tanto aumentando (21 dias) como inibindo (28 dias) a densidade de volume ocupada pelas fibras colágenas, enquanto que a dexametasona apresentou efeito contrário. Tais resultados indicaram que no processo inflamatório induzido por agentes flogógenos de intensidade forte (PMD) estimuladores da acentuada produção de LTs e PGs, o emprego de antiinflamatórios esteróides e não esteróides foi vantajosa em relação ao fármaco citostático.

1. INTRODUÇÃO

Os eventos iniciais decorrentes da inoculação de um agente flogógeno caracterizam-se por vasoconstrição imediata e transitória, seguida da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e transmigração celular. O aumento da permeabilidade vascular na região inflamada ocorre na microcirculação, que é constituída por arteríolas, capilares e vênulas. Em tal situação, há o alargamento dos pequenos poros de 6 nm de raio, ou fendas de 8 nm de extensão localizados na superfície do endotélio vascular por fatores de permeabilidade vascular, que contraem as células endoteliais permitindo o escape das proteínas plasmáticas necessárias à formação do exsudato inflamatório.

Como esse processo pode ser convenientemente analisado pela injeção intravenosa de corantes, como o azul de Evans, que se fixa nas proteínas do plasma se extravasando na região das vênulas e capilares (teste edemogênico), e considerando que a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular ocorrem praticamente ao mesmo tempo, é possível, conhecendo-se o mecanismo de ação dos fármacos e os resultados do referido teste, fazermos inferências quanto aos mecanismos envolvidos na estimulação flogógena, fonte geradora de substâncias químicas que são liberadas ou formadas enzimaticamente, denominadas de "mediadores químicos da inflamação" ou simplesmente de "fatores de permeabilidade".

Na fase inicial do processo inflamatório, devemos ressaltar a importância da participação das plaquetas e das células endoteliais. Apesar da relativa simplicidade estrutural do endotélio vascular, as células que o constituem são funcionalmente e metabolicamente ativas, de maneira que essas células desempenham papel importante no controle das fases aguda e crônica da resposta inflamatória. São capazes de secretar vários produtos biologicamente ativos, tais como: prostaciclina, trombomodulina, fator ativador do plasminogênio, fator uroquinase, moléculas semelhantes à heparina, IL-1, moléculas de adesão, endotelinas, angiotensina, fator relaxador derivado do endotélio e os fatores de crescimento (PDGF, CSF, FGF, TGF, IGF, TGF...).

Dentre esses produtos, particularmente, o fator relaxador derivado do endotélio (EDRF) e as endotelinas (ETs), quando liberados no foco inflamatório, modulam o fluxo sanguíneo e a reatividade vascular.

As endotelinas (ETs) constituem uma família de peptídeos com potentes propriedades vasoativas. São conhecidas como ET-1, ET-2 e ET-3 e o seu efeito biológico depende do tipo de receptor ativado. As células endoteliais produzem exclusivamente endotelina 1, enquanto que a ET-2 e ET-3, também, são sintetizadas e secretadas por outros tipos de células, dentre as quais as musculares lisas. Os receptores ETB localizam-se nas células endoteliais e estão relacionados com a secreção de óxido nítrico e/ou secreção da prostaciclina. Quando ativados por uma baixa concentração de ET-1 e ET-3 estimulam a ativação da óxido-nítrico-sintase e a secreção do óxido nítrico produzindo vasodilatação.

O receptor ETA é identificado exclusivamente nas células musculares lisas da parede vascular e ao ser ativado produz vasoconstrição e proliferação celular. Apresenta maior afinidade para a endotelina-1 (ET-1), seguida da ET-2 e ET-3 com igual afinidade. As células endoteliais, também, possuem os receptores ETB, que, igualmente, induzem a vasoconstrição. Ele não distingue entre os três isopeptídeos. Nesses receptores a ET-1 e a ET-3 apresentam a mesma afinidade. Recentemente, foi identificado um terceiro receptor (ETC) cuja função permanece desconhecida (VREN; HILEY; FAN²⁶¹, 1993).

A produção das endotelinas é dependente do aumento da concentração intracelular de cálcio [Ca^{2+}] mobilizada dos depósitos intracelulares (retículo sarcoplasmático), mediante a indução por hipóxia ou pela trombina, angiotensina II, vasopressina, arginina, fator beta transformador do crescimento (TGF- β) e IL-1 (LUSCHER & WENZEL¹³⁷, 1995). Em decorrência disso ocorre a ativação da fosfolipase C com a formação do inositol trifosfato (IP_3), capaz de mobilizar o cálcio do retículo endoplasmático e de diacilglicerol a partir do glicolípídeos contendo inositol presentes na membrana celular, que conjuntamente com o cálcio ativam a proteína quinase C (FELDMAN & YAR⁶⁵, 1991).

Uma outra via metabólica da produção de ETs é a ativação da Ca-calmodulina e tirosina quinase por IL-1 e TNF estimulando a produção de ET-1 e AMPc. Nessa ativação há produção das ETs e de AMPc. Esse nucleotídeo cíclico potencializa a secreção do óxido nítrico induzido por essas citocinas, exercendo um efeito bifásico em relação à produção das endotelinas. Em baixa concentração inibe a sua produção, enquanto que em alta concentração aumenta a produção delas (DURIEU-TRAUTMANN et al.⁵⁴, 1993).

A ET-1 é um potente peptídeo vasoativo que apresenta acentuada afinidade pelos receptores ETA, localizado exclusivamente nas células musculares lisas da parede vascular, produzindo vasoconstrição; sendo esse efeito dependente da produção de prostanóides (TXB₂, PGF₂, PGE₂, PGD₂) pelas células endoteliais dos capilares, uma vez que ativa a fosfolipase A₂. (STANIMIROVIC; McARRON; SPATZ²²⁰, 1994).

Há, também, uma estreita relação entre a ET-1 e a síntese e secreção do ativador (t) e do inibidor (I) do plasminogênio (PA) pelas células endoteliais, sugerindo que a fibrinólise mediada por essas células possa ser modulada por ET-1. Possivelmente, por meio de um mecanismo que envolve a ativação da fosfolipase C e o AMPc, que, respectivamente, estimulam e suprimem a produção endotelial do (t-PA) e do (PAI-1) (YAMAMOTO et al.²⁶⁴, 1993).

A produção desses mediadores, igualmente, é influenciada pela síntese de outros mediadores vasoativos, tais como trombina, histamina e citocinas (IL-1, TNF e FGF). As células endoteliais quando estimuladas por interleucina 1 (IL-1), via ativação da proteína c quinase (C kinase), produzem ET-1 e AMPc.

Esse nucleotídeo, além de suprimir a produção do PAI-1 potencializa a produção do óxido nítrico induzida por IL-1 e TNF, exercendo um efeito bifásico em relação à produção das endotelinas. Em baixa concentração inibe a produção delas, enquanto que

em alta as estimula (DURIEU-TRAUTMANN⁵⁴, 1993). O fator de crescimento fibroblástico (FGF) é uma outra citocina capaz de aumentar a produção do fator ativador do plasminogênio (PA-1) pelas células endoteliais (BLEI et al.¹⁹ 1993).

A ET-1, ainda, produz acentuado efeito vasoativo dependente da dose. Em baixa dose ativa os receptores ETB das células endoteliais produzindo efeito vasodilatador. O mecanismo envolvido parece ser independente da produção dos prostanóides, visto que antiinflamatórios não esteróides (indometacina e aspirina) não influenciaram o efeito vasodilatador da ET-1. O mecanismo parece envolver a ativação da óxido-nítrico-sintetase, resultando na produção do óxido nítrico e vasodilatação, visto o efeito atenuante apresentado pelo inibidor da ONs NG-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), na vasodilatação induzida por esse peptídeo (TANIGUCHI et al.²²⁹, 1994).

Com base no trabalho de FUKUDA et al.⁷⁴ (1991), segundo o qual, a desnudação endotelial vascular produziu efeito vasoconstritor, TANIGUCHI et al.²²⁹ (1994) ao constatarem a inibição parcial do efeito vasodilatador ET-3 pelos inibidores da síntese do óxido nítrico, concluíram que o mecanismo responsável pelo efeito vasodilatador da ET-3 somente era parcialmente dependente da produção desse produto enzimático.

Existe uma relação direta entre a síntese e secreção das endotelinas (ET-1 e ET-3) com a síntese das prostaglandinas. A ET-1 aumenta a produção da prostaciclina, enquanto que a ET-3 aumenta a produção de tromboxana A₂. Confirmando essa relação, GRASSI-KASSISSE et al.⁸² (1994) demonstraram que a secreção de PGE₂, PGF₁ e TBX₂ em resposta a ET-1 e adrenalina era significativamente reduzida pela indometacina, indicando que os prostanóides medeiam e/ou modulam a resposta vascular a ET-1.

Tais prostanóides, também, apresentam efeito sinérgico com outros mediadores inflamatórios, como a bradicina, os fragmentos do sistema do complemento e a histamina (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993). A prostaciclina, igualmente, pode agir por meio de um mecanismo de "feedback" como um regulador da síntese dos leucotrienos (LTs) pelas células endoteliais, uma vez que estimula metabolização por essas células do LTB₄ a partir de LTA₄ e LTC₄ produzidos pela ativação da 5-lipooxigenase presente nos neutrófilos (FEINMARK⁶⁴, 1992).

Portanto, mediadores produzidos no local da inflamação tais como: a IL-1, PGs, TNF- α , Fator beta transformador do crescimento (TGF- β) e o interferon gama (INF- γ) (WREN; HILEY; FAN²⁶¹, 1993), bem como os fármacos antiinflamatórios esteróides, não esteróides e os medicamentos citostáticos por estimularem ou inibirem a produção daquelas citocinas (prostanóides) moduladoras das ETs podem influenciar a produção e/ou o efeito dessas citocinas.

superindo que tais fármacos não apresentam qualquer efeito inibidor dos receptores para essa citocina. Contudo, o pré-tratamento com dexametasona por 24 horas diminuiu o número desses receptores. O mecanismo envolvido é a diminuição do número dos sítios de ligação para a ET-1, resultando na redução em 40% da produção de inositol trifosfato (IP_3) e, conseqüentemente, do aumento da concentração intracelular do cálcio (STANIMIROVIC; McCARRON; SPATZ 220, 1994).

Além das endotelinas, o diâmetro e a permeabilidade vascular, também, são influenciadas por produtos enzimáticos como o óxido nítrico produzido pela óxido-nítrico-sintase (ONs) e por prostanóides produzidos via ativação da ciclooxigenase, visto que a síntese desses produtos é modulada pela endotelina 1 (ET1) (LOPEZ-BELMONTE & WHITTLE 133, 1994).

O óxido nítrico é sintetizado pela óxido-nítrico-sintase (NOs) presente nas células endoteliais, mediante a oxidação de um dos dois átomos nitrogênio-guanidínicos da L-arginina, por uma via dependente do Ca^{++} /calmodulina, igualmente, influencia a dinâmica vascular, pois produz vasodilatação aumentando a permeabilidade vascular. Para a atividade da ONs além do referido substrato, ainda, é necessário a presença de cofatores essenciais, tais como: NADPH, FAD, FMN e tetrahidrobiopterina (BH_4). Desses, a BH_4 é um fator essencial para a atividade das hidroxilases de aminoácidos contendo núcleo aromático (SCHOEDON et al. 205, 1993).

As ETs 1 e 3 em baixa concentração podem ativar os receptores ETB localizados nas células endoteliais, produzindo via ativação da óxido-nítrico-sintetase a secreção do óxido nítrico, cujo efeito produz vasodilatação (CHOU & PORUSH 32, 1995). Além do mais, a transcrição da informação genética necessária à expressão da NOs é induzida sinergicamente por citocinas e produtos bacterianos (BOGDAN et al. 20, 1993).

Portanto, várias citocinas produzidas pelas próprias células endoteliais ou liberadas no foco inflamatório pelas demais células lá presentes, podem, tanto autócrina como paracrinamente estimular as células endoteliais à produção do óxido nítrico. A secreção desse produto enzimático, indiretamente, também, é influenciada pela concentração da PGE_2 e pelo fator necrótico tumoral (TNF). Baixas concentrações da PGE_2 (1 - 10 ng/mL), por induzir a produção de TNF, estimula a expressão da NOs e a secreção de óxido nítrico, enquanto que esse prostanóide em alta concentração (>50 ng/mL) inibe a secreção de TNF- α , bloqueando a síntese de óxido nítrico (MILANO et al. 152, 1995).

O interferon gama ($INF-\gamma$) apesar de não aumentar o conteúdo de NOs-RNA, também, intensifica a expressão da NOs nas células endoteliais estimulando a produção do óxido nítrico (NO). A IL-1 é uma outra citocina capaz de estimular as células endoteliais via ativação da proteína C quinase. A quinase, Ca-calmodulina e tirosina quinase à produção da ET-1 e do AMPc, que por sua vez potencializa a secreção do óxido nítrico induzido por citocinas como a IL-1 e TNF (DURIEU-TIRAUTMANN et al. 54, 1993).

Existe, também, a interação competitiva, possivelmente, pelo sítio ativo da guanilato ciclase, entre o óxido nítrico de origem endotelial e a nitroglicerina (NG)

produzida pelas células musculares lisas da parede vascular, em relação ao efeito vasodilatador, visto que o ON atenuou esse efeito, enquanto a oxihemoglobina, um inibidor da ativação dessa enzima, acentuadamente diminuiu o efeito vasodilatador da NG (DINERMAN; LAWSON; MEHTA⁵⁰, 1991).

A tensão do oxigênio está diretamente relacionada com o diâmetro vascular. Em estados transitórios de hipóxia há uma contração passageira, seguida por uma acentuada relaxação vascular. MESSINA et al.¹⁴³ (1992) demonstraram que ao nível arteriolar a queda da PO_2 de 150 mm Hg para 15 mm Hg induz à vasodilatação, a qual é inibida pela desnudação endotelial e por indometacina, indicando que a dilatação arteriolar é mediada por prostaglandinas derivadas do endotélio e produzidas em decorrência da ativação da fosfolipase A_2 estimulada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio induzida pela depleção do oxigênio.

Contudo, quando a hipóxia é prolongada há uma contração vascular sustentada, não influenciada pela adenosina, endotelinas, inibidores da ciclooxigenase e radicais livres. Ela depende basicamente da energia obtida pela hidrólise do ATP, promovida pela ativação da ATPase dependente do Mg^{+} . O mecanismo envolvido não parece ser causado por uma citocina vasoconstritora (fator de contração derivada do endotélio-EDCF), mas, sim, devido a inibição da óxido nítrico sintetase constatada durante a hipóxia prolongada.

Além da vasoconstrição, uma outra consequência importante da hipóxia prolongada é a indução das células musculares lisas à produção de citocinas mitogênicas para as células endoteliais, tais como as prostaglandinas (PGs) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que ao se ligarem aos receptores associados à proteína G, e a receptores capazes de promoverem a hidrólise do inositolglicolípídeos de membrana das células endoteliais, ativam proteínas citoplasmáticas estimulando a produção de fatores de transcrição nuclear iniciadores da proliferação celular (MICHIELS et al.¹⁴⁵, 1994). Tal efeito desempenha um papel importantante na formação do tecido de granulação, necessário à formação do granuloma.

Os produtos tóxicos derivados do oxigênio (radicais livres, incluindo o radical superóxido) gerados por oxidases quando da síntese das citocinas inflamatórias como das PGs, também, podem produzir lesões microvasculares decorrentes da formação das pontes dissulfeto nas proteínas superficiais da membrana; da cisão das ligações lipídio-lipídio; e da peroxidação lipídica, aumentando a permeabilidade vascular e o extravasamento das grandes moléculas. Por outro lado, a hiperóxia produz efeito vasoconstritor (COTRAN; KUMAR; ROBBINS³⁶, 1989). Tais situações são facilmente evidenciadas por meio da quantificação do extravasamento do corante Azul de Evans no foco inflamatório.

O Ion $[Ca^{2+}]$, igualmente, é essencial para a dinâmica vascular. Sempre que as fibras musculares lisas da parede vascular são estimuladas a contrair, esse Ion é liberado do retículo sarcoplasmático para as miofibrilas. Por outro lado, quando a fibra não está sofrendo contração esse Ion é armazenado na luz do retículo sarcoplasmático. Nesse particular, ressalta-se a importância da síntese de PGs para o aumento da

concentração intracelular do cálcio $[Ca^{2+}]$, visto que o aumento da concentração intracelular de AMPc decorrente da ativação da adenilciclase pelas prostaglandinas produz o aumento do fluxo desse íon através da membrana.

O aumento da concentração intracelular do AMPc, também, apresenta em relação à síntese da endotelina 1 (ET-1) efeito bifásico. Em alta concentração estimula a produção dessa citocina, enquanto que em baixa concentração inibe a sua produção. Esse nucleotídeo, igualmente, está envolvido no mecanismo responsável pelo efeito vasodilatador apresentado por essa citocina em baixa concentração, uma vez que potencializa a produção do óxido nítrico pela óxido-nítrico-sintase (DURIEU-TRAUTMANN et al.⁵⁴, 1993).

Demonstrando a relação existente entre a produção do ácido araquidônico e o efeito vasoconstritor apresentado pela ET-1, relativamente ao aumento da concentração intracelular de cálcio, STANIMIROVIC; McCARRON; SPAZ.²²⁰ (1994) demonstraram que os inibidores da produção do cálcio (verapamil) inibem a produção do ácido araquidônico pelas células endoteliais.

Logo, a ativação dos receptores para as endotelinas, especialmente o da ET-3 promove a resposta vasodilatadora inicial mais potente aumentando a concentração intracelular do $[Ca^{2+}]$, por meio da energia fornecida pela adenosina trifosfatase dependente de cálcio (ATPase), estimula a síntese do fator relaxador derivado do endotélio (EDRF) e óxido nítrico (NO) (EMORI; HIRATA; MARUMO⁵⁸, 1991).

Várias outras citocinas e fatores de crescimento liberados pelas demais células presentes no foco inflamatório podem agir paracrinamente (nas células vizinhas), dentre as quais as células endoteliais e musculares lisas da parede vascular, ativando receptores responsáveis pela vasoconstrição ou vasodilatação.

Entre os mediadores vasoativos capazes de induzir a vasoconstrição destacam-se: o fator 1 de contração derivado do endotélio (EDCF1); o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF); a tromboxana A₂; o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF); e, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que apresenta semelhança estrutural com PDGF.

Por outro lado, a substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os leucotrieno B₄ (LTB₄), a prostaglandina E₂ (PGE₂), a bradicinina, a neuroquinina, o peptídeo relacionado ao hormônio paratireoidiano (PTHrP) e o leucotrieno E₄ (LTE₄) produzem vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular.

Tais efeitos, também, podem ser induzidos por outros mediadores químicos liberados no foco inflamatório. A substância P secretada pelas células neurais pode induzir o relaxamento mediante três mecanismos: 1)- relaxação dependente do endotélio mediada pela secreção de óxido nítrico, resultando em aumento do GMPc (alta e baixa concentração); 2)- relaxação independente do endotélio relacionada com o aumento do AMPc causada por secreção das prostaglandinas do tecido subendotelial (alta

concentração); relaxação mediada pela secreção do endotélio de mediador (es), ainda, não identificado (s) (alta concentração) (ENOKIBORI; OKAMURA; TODA ⁵⁹, 1994).

Além desses mecanismos, FOREMAN & JORDAN ⁷⁰ (1983) sugeriram a possibilidade do mecanismo responsável pelo efeito vasodilatador da substância P e do gene relacionado ao peptídeo da calcitonina (CGRF) ser decorrente da liberação de histamina pelos mastócitos ou pela estimulação da produção do fator ativador das plaquetas (PAF) pela substância P (BUSSOLINO et al. ²⁶, 1986). Como os antagonistas dos receptores para a histamina, bem como a indometacina e os antagonistas do fator ativador das plaquetas não inibiram o efeito da substância P, é pouco provável que haja a participação da histamina, das prostaglandinas e do fator ativador das plaquetas no mecanismo de ação da substância P. Por outro lado, o fato dos antagonistas dos receptores NK1 (que medeiam os efeitos biológicos das taquiclininas) inibir o efeito da substância P indica a possibilidade da ativação desses receptores ser o responsável por seus efeitos biológicos (FAN et al. ⁶¹, 1993).

O peptídeo relacionado ao hormônio paratireoioldiano é uma outra citocina liberada no foco inflamatório que apresenta propriedades vasodilatadora. As células musculares lisas de vários tecidos, incluindo o tecido vascular apresentam receptores para PTH/PTHrP, que ao serem ativados produzem vasodilatação. Por outro lado, as células endoteliais apesar de produzirem PTH/PTHrP não possuem receptores para esses peptídeos. Contudo, podem agir paracrinamente nas células musculares lisas da parede vascular induzindo à vasodilatação (RIAN ¹⁸⁰, 1994). Portanto, fármacos como a dexametasona que inibem a expressão do RNAm do PTHrP, igualmente, inibem a vasodilatação induzida por esse peptídeo, enquanto que os fármacos inibidores da síntese protéica como o metotrexato, podem estimular a transcrição e a estabilização do RNAm do PTHrP (ROSOL & CAPEN ¹⁹², 1992).

As células endoteliais reagem a estimulação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF) aumentando a expressão da E-seletina, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e da molécula de adesão celular vascular, intensificando a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (VCAM-1) (KLEIN et al. ¹¹⁹, 1993). No processo de migração transendotelial dos neutrófilos participam a integrina beta 2 (CD18) e a molécula de adesão célula endotelial-plaquetária (PECAM-1; CD31). Essas citocinas, ainda, induzem a secreção pelas células endoteliais da α -trombina, um mediador pró-coagulante, que aumenta a aderência dos neutrófilos a superfície endotelial, bem como a contração do citoesqueleto dessas células, intensificando a permeabilidade vascular e a transmigração celular (DRAKE et al. ⁵³, 1992).

Recentemente, COOPER et al. ³⁵ (1992) demonstraram que a proteína associada à integrina (IAP-CD47) é uma outra molécula essencial para a migração transendotelial dos neutrófilos, visto que anticorpos bloqueadores dessa proteína, inibiram a sua migração sem alterar a expressão das proteínas de adesão ou a produção de IL-8 pelas células endoteliais.

As plaquetas, também, têm participação importante na fase aguda do processo inflamatório, pois a sua ativação determina a liberação das moléculas de adesão p-seletina dos grânulos- α , capazes de mediar a sua interação com os leucócitos neutrófilos, localizados nas proximidades dos vasos agredidos, de maneira que essa glicoproteína transmembrana, semelhantemente ao peptídeo fator do crescimento epidérmico (EGF), pode participar do mecanismo de localização dos polimorfonucleares neutrófilos, no interior do foco inflamatório. Igualmente, secretam o fator 4 plaquetário (PF-4) (antiheparina) e o fator do crescimento derivado das plaquetas (PDGF), ambos quimiotáticos para neutrófilos.

A PGI_2 e TXs produzidas pelas plaquetas ativadas durante a agregação, a partir do metabolismo do ácido araquidônico constituinte da sua membrana celular são outros mediadores secretados no foco inflamatório, que apresentam acentuada importância na fase inicial desse processo, pois dependendo da concentração intracelular do AMPc por eles induzido, aumentam ou não, a expressão das glicoproteínas receptoras do fibrinogênio (GpIIb) e/ou fator de Von Willebrand (GpIb), conseqüentemente, aumentando ou diminuindo a agregação plaquetária e o extravasamento plasmático decorrente das microlesões ao endotélio vascular, as quais, na fase inicial da estimulação flogógena são particularmente importantes para a formação do exsudato inflamatório (COTRAN; KUMAR; ROBBINS³⁶, 1989; CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982).

Portanto, fármacos antiinflamatórios por inibirem a produção dos prostanóides relacionados ao mecanismo da agregação plaquetária, via AMPc, bem como os fármacos esteróides e as drogas citostáticas inibidoras das citocinas ativadoras da adenilciclase e da fibrinólise podem interferir nesse processo.

Para que os leucócitos consigam atingir a região inflamada ainda é necessário que haja a destruição da matriz extracelular subendotelial (ECM). As plaquetas participam desse processo mediante a produção da heparinase, enquanto que as células endoteliais promovem a destruição por meio da síntese e secreção das proteases, heparinases e sulfatases. Em relação aos leucócitos, a atividade destrutiva dos neutrófilos e linfócitos é superior a dos monócitos. Cada tipo de célula apresenta uma atividade enzimática predominante, sendo a atividade da heparinase, da protease e da sulfatase, respectivamente, mais acentuada nos linfócitos, neutrófilos e monócitos. A produção dessas enzimas é influenciada por citocinas como IL-1, TNF, e IL-8. A IL-1 + TNF aumentam a degradação da matriz extracelular (ECM) induzida por neutrófilos e células endoteliais. Contudo, inibem a degradação da ECM induzida pelos linfócitos. Já a IL-8 aumenta a degradação da matriz celular endotelial (ECM) por neutrófilos, linfócitos e células endoteliais. A IL-1 + TNF e IL-8 estimularam nas células endoteliais e monócitos a atividade da sulfatase, enquanto que em monócitos a atividade dessa enzima somente foi induzida pela citocina quimiotática para monócitos e pelo fator ativador de macrófagos (BARLETT; UNDERWOOD; PARISH¹², 1995).

Além desses mediadores, MANCUSO; FLOWER; PERRETTI¹³⁹ (1995) demonstraram que a migração transendotelial é mediada por uma baixa concentração de lipocortin 1,

visto que o pré-tratamento com anti-inflamatórios esteróides (dexametasona) aumentou o nível de lipocortin nos leucócitos circulantes, mas não modificou o número de células aderidas ao endotélio vascular. Contudo, aproximadamente 85% dos leucócitos aderentes ao endotélio vascular subsequentemente se separaram e voltaram à corrente sanguínea, enquanto que a população leucocitária restante teve o processo da diapedese, comparativamente ao grupo controle, prolongado de três à quatro vezes.

Várias citocinas quimiotáticas produzidas pelas células presentes no local da inflamação e decorrentes da ativação dos sistemas da coagulação, fibrinolítico e do complemento (presentes no plasma extravasado consequente ao aumento da permeabilidade vascular), por proteínas teciduais alteradas resultantes da liberação e da ativação enzimática no foco inflamatório, ligam-se em receptores específicos (possivelmente do tipo Integrina) localizados na superfície da membrana celular dos neutrófilos causa a ativação da proteína G e da fosfolipase C, produzindo inositol trifosfato; aumentando a concentração intracelular do cálcio; e, estimulando a migração dos neutrófilos em direção ao foco inflamatório (CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982).

Lá chegando, os neutrófilos aumentam em número, e com a ligação do agente flogógeno aos receptores para o C3b e Fc localizados na superfície da membrana celular dessas células, passam a produzir enzimas capazes de destruir os componentes colagênicos, não colagênicos e proteoglicanas teciduais, tais como: a β -glucuronidase, β -galactosidase, fosfatase ácida, mieloperoxidase, catepsina ácida e lisozima, resultando na produção de peptídeos leucotáticos. Essas células, também, são estimuladas pelo fator ativador de plaquetas (PAF) a produção dessas enzimas e do ânion superóxido, exacerbando a destruição tecidual capaz de gerar vários outros fatores leucotáticos, dos quais se destacam os produtos resultantes da ativação dos sistemas do complemento, da coagulação e da fibrinólise, bem como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas e fatores de crescimento. Durante esse processo há o aumento do consumo de oxigênio, da glicólise e da formação do peróxido de hidrogênio (CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982).

Quando o agente flogógeno não é inerte como são a carragenina, a placa microbiana dental e a paracoccidiodina, a sua persistência ao nível do foco inflamatório, determina a contínua produção de mediadores quimiotáticos para as células inflamatórias, que, na dependência da suscetibilidade celular, promovem o contínuo recrutamento para o local da inflamação. Como os monócitos e os linfócitos respondem aos fatores quimiotáticos com uma velocidade menor do que as células endoteliais neutrófilos fibroblastos e eosinófilos, essas células são observadas mais tardiamente no foco inflamatório, não obstante, constituírem a população celular predominante dos granulomas.

Nessas lesões, muitos aspectos da atividade secretora dos macrófagos e de sua modulação farmacológica permanecem desconhecidos (KATONA & BLENGIO¹¹⁴, 1975; LEONI et al.¹²⁹, 1985). Atualmente, aceita-se que a secreção de enzimas hidrolíticas, de fatores de crescimento e de outras citocinas pelos macrófagos, esteja diretamente relacionada ao mecanismo molecular de formação dos granulomas inflamatórios (DAVIES & ALLISON⁴⁴, 1976).

Estas lesões podem ser produzidas por agentes biológicos tais como: os agentes da paracoccidioidomicose, tuberculose e hanseníase. Recentemente, pesquisas têm demonstrado a participação da parede celular de microorganismos da placa bacteriana dental, como agente produtor de granulomas (CATANZARO-GUMARÃES²⁷, 1982). Ressalta-se, nesse particular, que os mecanismos biopatológicos envolvidos na formação dessas lesões tanto intra como extrabucais, igualmente, têm participação na patogênese das moléstias inflamatórias de origem odontogênica como a doença periodontal e lesões periapicais. Nessas doenças, destacamos, no controle do processo de reabsorção óssea, a participação dos produtos de secreção dos macrófagos.

Atualmente, no controle via osteoblasto desse processo, tem sido atribuída grande importância às citocinas IL-1, TNF- α e aos fatores de crescimento (TGF, PDGF) produzidos pelos macrófagos no estágio avançado da doença periodontal inflamatória. A proximidade dos macrófagos com os osteoblastos, em áreas de reabsorção óssea ativa, sugere que os produtos bacterianos e de secreção dos macrófagos podem interagir com os osteoblastos ativando-os à reabsorção óssea (AKAMINE et al.³, 1994). Outro mecanismo envolvido decorre do efeito reabsortivo direto dessas células, visto que os macrófagos em condições patológicas tornam-se positivos para o TRAP, participando ativamente da fase inicial de reabsorção radicular (BRUDVIK & RYGH²⁵, 1994).

As lesões inflamatórias crônicas granulomatosas, também, podem ser produzidas por vários outros agentes não biológicos tais como a sílica, asbestos e carragenina. Vários materiais de uso odontológico (amálgama dentário e fio de sutura) podem desenvolver esse tipo de lesão. Mesmo as partículas de materiais protéticos usados em implantes, por meio de um mecanismo dependente do tamanho e da concentração dessas partículas podem estimular a atividade secretora dos macrófagos induzindo a reabsorção óssea (GLANT et al.⁷⁹ 1993).

Os granulomas são lesões constituídas predominante pelo acúmulo de macrófagos. A continuidade dos granulomas, depende, portanto, da contínua migração e proliferação destas células em nível do foco inflamatório crônico. Alguns dados confirmam a participação da atividade secretora dos macrófagos na produção de granulomas inflamatórios (PAGE; DAVES; ALLISON¹⁶⁸, 1974; DAVES & ALLISON⁴⁴, 1976; AKAMINE et al.³, 1994).

Há, portanto, uma relação direta entre a capacidade do estímulo flogógeno em induzir a inflamação crônica granulomatosa *in vivo*, e a sua habilidade em estimular a atividade secretora dos macrófagos, quando interage *in vitro* com essas células. (PANTALONE & PAGE¹⁷², 1977; DAVES & ALLISON⁴⁴, 1976; DAVES & BONNEY⁴⁵, 1979; CATANZARO-GUMARÃES²⁸, 1990). Assim, *in vivo*, os agentes flogógenos indutores de granulomas também estimulam, *in vitro*, a secreção pelos macrófagos de enzimas lisossômicas e de outros produtos biologicamente ativos (PAGE; DAVES; ALLISON¹⁶⁸, 1974; DAVES & ALLISON⁴⁴, 1976).

A liberação de hidrolases ácidas pelos macrófagos induz a destruição tecidual no foco inflamatório crônico, gerando substâncias quimiotáticas para neutrófilos e monócitos

como C3a e C5a, fibrinopeptídeos, linfocinas, fatores de crescimento (PGDF, TNF, FGF, EGF, TGF) e produtos de degradação do colágeno, que propiciam o contínuo recrutamento celular para o tecido inflamado. Além da contínua quimiotaxia dos monócitos, que ao nível do foco inflamatório se transformam em macrófagos, a destruição tecidual gera o aparecimento de áreas necróticas que contribuem para estimular a proliferação fibroblástica, em nível das lesões crônicas granulomatosas.

A proliferação fibroblástica e a produção de fibras colágenas constituem aspectos característicos dos granulomas inflamatórios imunogênicos e correspondem a outra atividade dos macrófagos, qual seja, a de controlar o crescimento e a atividade de outras células. A propósito disso, tem sido demonstrada que a produção do fator de crescimento fibroblástico (FGF) por macrófagos obtidos do foco inflamatório crônico ou do processo de reparo, pode estimular a proliferação de fibroblastos modulando a síntese de colágeno pelas células endoteliais (DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN ⁴⁸, 1982; HOM & MAISEL ¹⁰⁰, 1992).

Vários outros produtos de secreção dos macrófagos e das demais células presentes no foco inflamatório, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator transformador do crescimento (TGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), também, participam ativamente do processo de neoformação vascular (NICOSIA; NICOSIA; SMITH ¹⁵⁴, 1994). Portanto, quando o agente flogógeno fagocitado não é inerte e interage com os macrófagos estimulando a sua atividade secretora, essas células são continuamente recrutadas e ativadas no foco inflamatório (SPECTOR, WALTERS; WILLOUGHBY ²¹⁸, 1965).

A secreção de enzimas hidrolíticas liberadas pelos macrófagos ativados causa dano (destruição) tecidual, originando antígenos capazes de desencadear reações imunes e de formar imunocomplexos com os anticorpos circulantes ativando o complemento. Com isso, gera-se um sistema contínuo de recrutamento e ativação dos macrófagos, que culmina com a formação de granulomas do tipo imunológico com alto índice de renovação celular, cuja população, além do recrutamento monocitário, depende, também, da proliferação celular local. Nesse particular, ressaltamos a importância no controle da proliferação celular dos produtos metabólicos derivados do ácido araquidônico (PGs e LTs) e dos fatores de crescimento sintetizados e secretados pela população celular presente no local da inflamação.

É o que acontece, por exemplo, com os granulomas produzidos por sílica, asbestos, carragenina, imunocomplexos, placa bacteriana dental, zymosan e microorganismos que desenvolvem o modelo intracelular de parasitismo (DAVIES et al ⁴³, 1974; PAGE; DAVIES; ALISSON ^{168,169}, 1974; ALLISON & DAVIES ⁷, 1975; CATANZARO GUIMARÃES ²⁸, 1990). Entretanto, quando os agentes flogógenos são inertes como a maioria dos corpos estranhos (carvão) e alguns materiais de uso odontológico (amálgama dentário e o fio de sutura), que não induzem a secreção de enzimas lisossomais pelos macrófagos, geram-se granulomas autolimitados, constituídos apenas por poucos macrófagos que fagocitam o material (SPECTOR ²¹⁶, 1970).

Existe, pois, a possibilidade de se modificar, farmacologicamente, o comportamento dos macrófagos em granulomas imunológicos de alta renovação celular. Há evidências de que antiinflamatórios esteróides e os fármacos citostáticos, inibidores da síntese protéica, reduzem a secreção de enzimas hidrolíticas e de outros produtos biologicamente ativos (LTB_4 , PGE_2 e $\text{TNF-}\alpha$) pelos macrófagos ativados (GEE et al.⁷⁸, 1982). Os antiinflamatórios não esteróides, esteróides e as drogas citostáticas afetam a proliferação e a diferenciação das células progenitoras mielóide dos macrófagos, influenciando a quantidade dessas células na resposta inflamatória.

Contudo, em outros sistemas celulares como os polimorfonucleares neutrófilos, altas concentrações de corticosteróides estabilizam a membrana lisossomal, isto é, estimulam a produção de hidrolases ácidas, mas impedem à sua secreção. Nesse mesmo sistema celular, baixas concentrações de fenilbutazona, indometacina e de ácido acetilsalicílico produzem o mesmo efeito. Não obstante, doses mais altas, desses mesmos antiinflamatórios não-esteróides reverterem o efeito estabilizador estimulando a secreção enzimática (DOWES; ROBIN; STENDLE⁵², 1975).

As prostaglandinas da série E alteram a morfologia e a função dos macrófagos. A PGE_2 , por exemplo, reduz a fagocitose dos macrófagos *in vitro* diminuindo a secreção de enzimas lisossomais, a produção de TNF e a expressão de antígenos de superfície (OROPEJA & WERB¹⁶⁵, 1985). Os macrófagos peritoneais de camundongos produzem quantidade elevada de PGE_2 quando estimuladas pelo zymosan, ao passo que os macrófagos ativados *in vivo* estimulados com B.C.G. produzem comparativamente menos prostaglandinas E (HUMES et al.¹⁰⁵, 1980). Devido as diferenças na secreção de prostaglandinas entre as populações de macrófagos funcionalmente diferentes, as pesquisas indicam que as prostaglandinas apresentam um papel central no controle dessas células (OROPEJA & WERB¹⁶⁵, 1985; FIEREN et al.⁶⁹, 1992). Atualmente, além das prostaglandinas, têm sido atribuída acentuada importância ao bloqueio farmacológico de várias citocinas (IL-1 , TNF , $\text{INF-}\gamma$) e dos fatores de crescimento (FGF , EGF , $\text{TGF}...$) produzidos pelos macrófagos, diretamente, envolvidos na patogênese do processo inflamatório granulomatoso e na reabsorção óssea associada.

Trabalhando com o perfil enzimático dos granulomas, induzidos pela implantação subcutânea da suspensão da parede celular dos microorganismos da placa bacteriana dental, foi verificado que o referido perfil sofre influências de antiinflamatórios não-esteróides como: o sulindac, ibuprofen, naproxen e glucametacina (CATANZARO-GUIMARÃES²⁸, 1990). Também, têm sido constatado em sucessivos trabalhos (MENEZES & CATANZARO-GUIMARÃES¹⁴⁰, 1985; AKATSU & CATANZARO-GUIMARÃES⁶, 1986), que esses antiinflamatórios influenciavam a fisiopatologia dos granulomas, pois apresentaram acentuado efeito antiproliferativo.

Assim, utilizando outros fármacos antiinflamatórios (esteróides, não-esteróides e citostáticos) e agentes flogógenos de intensidade fraca, média e moderada, os referidos estudos foram aprofundados, objetivando obter informações mais precisas a respeito dos mecanismos biopatológicos envolvidos na estimulação flogógena inflamatória aguda e crônica, assim como do mecanismo de ação dos fármacos testados, a fim de que

possam ser utilizadas no tratamento auxiliar de doenças inflamatórias crônicas de longa duração. Ressaltamos, ainda, a importância desse estudo, visto que os produtos de secreção dos macrófagos, também, estão diretamente envolvidos na produção de imunoglobulinas e no controle do processo osteolítico induzido por essas lesões.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ATIVIDADE SECRETORA DOS MACRÓFAGOS E AS LESÕES GRANULOMATOSAS

A despeito do grande interesse despertado na literatura especializada quanto à atividade secretora dos macrófagos e o papel dessa atividade na fisiopatologia dos granulomas inflamatórios, muito ainda precisa ser pesquisado no que concerne à modulação farmacológica do mecanismo de síntese e secreção, nesse sistema celular.

Entende-se por atividade secretora dos macrófagos, a capacidade dessas células quando estimuladas por diferentes agentes flogógenos, como: os peptídeoglicanos da parede celular de estreptococos e dos microorganismos da placa bacteriana dental, formalina, serotonina, imunocomplexos, homogenados de vários microorganismos e as partículas tóxicas (sílica, berílio e asbestos) em estimular a síntese e secreção de vários produtos biológicos ativos, dentre os quais, os produtos liberados por enzimas lisossomais, tais como: hidrolases ácidas lisossomais, lisozima e proteinases neutras (DAVIES & BONNEY⁴⁵, 1979).

Há uma relação direta entre a secreção das enzimas lisossomais e a estrutura do agente flogógeno. Quando o agente é particulado, como são os complexos imunes, a parede celular bacteriana e as partículas minerais, a secreção destas enzimas é acentuada. Há a rápida mobilização das enzimas lisossomais estocadas objetivando a destruição desses agentes. Com isso, ocorre o seu escape para o tecido conjuntivo causando destruição. Muitas dessas partículas por apresentarem na sua composição metais capazes de interagirem com sialoglicoproteínas da membrana lisossomal formam agregados protéicos capazes de aumentar a pressão intralisossomal, rompendo-as. Por outro lado, quando estímulo é gerado por agentes solúveis como o C_{3b} o dextran sulfato e linfocinas, há considerável diminuição na secreção dessas enzimas (DAVIES & BONNEY⁴⁵, 1979).

É possível interferir-se farmacologicamente no seu mecanismo de síntese e secreção. WERB²⁵² (1978) demonstrou que os glicocorticóides podem inibir a síntese das proteases neutras (colagenases, elastases e proteinases fragmentadoras dos proteoglicanos) pelos macrófagos peritoneais BANNWARTH et al.¹¹ (1994), também, sugeriram que o metotrexato apresentaria efeito inibitório das enzimas proteolíticas. *In vitro*, VIGNON et al.²⁴⁴ (1991) verificaram que antiinflamatórios não esteróides (salicilato de sódio, indometacina, diclofenaco sódico, piroxicam e tenoxicam), quando administrados nas concentrações convencionais reduziram a atividade das enzimas proteoglicanase e colagenase presente no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. Destes, os maiores efeitos foram obtidos com o piroxicam e com o tenoxicam. Esses fármacos reduziram a atividade da proteoglicanase em 48,2% e 68,3% e suprimiram a atividade da colagenase em 19,1 e 36,8%, respectivamente. Possivelmente, o

mesmo deve ocorrer em relação à atividade dessas enzimas no local da inflamação crônica granulomatosa.

Outrossim, os componentes da dieta podem influenciar o estado de ativação dos macrófagos e a síntese e secreção das enzimas lisossomais. SOMERS & ERICKSON²¹⁵ (1994) demonstraram a diminuição da quantidade de TNF- α do sobrenadante, em cultura de macrófagos peritoneais, provenientes de ratos submetidos à dieta com alto teor de ácidos graxos e estimulados com lipolissacarídeos bacterianos, mediante a adição na cultura de uma pequena quantidade de PGE₂ exógena. Esse efeito indicou que os ácidos graxos agem por meio de um mecanismo dependente da baixa concentração de PGs, aumentando a secreção das enzimas lisossomais pelos macrófagos.

Os macrófagos são as células centrais dos granulomas inflamatórios. Dependendo da natureza do agente flogógeno estimulante, igualmente, sintetizam e secretam outros produtos biologicamente ativos, tais como: pirogênio, fatores estimuladores dos linfócitos (interleucina-1), fator de crescimento fibroblástico (FGF), prostaglandinas (PGs) e nucleotídeos cíclicos (AMPc) e (GMPc) (GEE et al.⁷⁸, 1982; DIEGELMANN; COHEN; CAPLAN.⁴⁸, 1982; LEONI et al.¹²⁹, 1985).

No tecido de granulação, presente na fase inicial de formação do granuloma, predominam os neutrófilos e as células endoteliais, porém, os eosinófilos capazes de fagocitar complexos imunes contendo IgE, também, podem ser visualizados em número reduzido. Essas células secretam vários mediadores químicos, destacando-se: as proteínas catiônicas localizados no interior dos grânulos citoplasmáticos, elcosanóides específicos e várias outras citocinas capazes de influenciar a resposta inflamatória, destacando-se, entre essas: o TGF- β , IL-3, GM-CSF, IL-5, IL-6, TNF- α e a proteína inflamatória macrofágica 1 α (MIP-1 α) (COSTA et al.³⁷, 1993).

Dessas, devemos salientar a importância da MIP-1 α do TNF- α . A primeira devido aos seus vários efeitos pró-inflamatórios estimula os macrófagos e, possivelmente, outros leucócitos, a síntese e secreção do TNF- α , IL-1 α , IL-6 e de outros mediadores químicos pró-inflamatórios. A segunda, pode estimular a expressão gênica de várias citocinas; a síntese protéica e a expressão de proteínas de adesão e antígenos de histocompatibilidade; ativar neutrófilos, macrófagos e eosinófilos a degradação da matriz extracelular; e, estimular a angiogênese e a proliferação de vários tipos de células.

Para explicar a presença dos eosinófilos no foco inflamatório, tem sido proposto que a IL-5 presente no tecido inflamado estimularia a migração celular, visto que essa citocina induz à expressão da integrina CD11b ou CD18 nos eosinófilos, aumentando a sua adesão à parede vascular (LOPEZ et al.¹³², 1986). A ativação dos linfócitos T participantes da resposta imune tecidual, associada ao processo inflamatório, também, estimula a produção de IL-5 e de outras citocinas como a IL-3 e o fator estimulador de colônia macrofágico-granulocítico (GM-CSF), capazes de estimular a produção das moléculas de adesão nas células endoteliais, aumentando a migração e a quimiotaxia de monócitos,

neutrófilos e eosinófilos em direção ao foco inflamatório (SANDERSON¹⁹⁸, 1992). Portanto, é possível que todos os medicamentos que interferem na produção das moléculas de adesão impedindo a ligação dos monócitos e neutrófilos à parede vascular, igualmente, diminuam a migração dos eosinófilos em direção ao foco inflamatório.

Como mencionamos anteriormente, os neutrófilos juntamente com as células endoteliais constituem a população celular predominante da fase inicial das lesões granulomatosas. Em grande parte a presença dos polimorfonucleares neutrófilos no foco inflamatório se deve à liberação de agentes quimiotáticos produzidos pelo organismo em resposta aos microorganismos infectantes, tais como: a anafilotoxina C5a formada em consequência da ativação das vias clássica ou alternativa do complemento por N-formylmethionyl peptídeo (Met-Leu-Phe) e outros peptídeos; produtos do metabolismo do ácido araquidônico (LTs); e o fator ativador das Plaquetas (PAF), que é capaz de estimular os neutrófilos a produção das enzimas lisossomais e do radical superóxido (BICKEL¹⁸, 1993).

A ligação de partículas fagocitáveis aos receptores para C3b e FC localizados na superfície celular dos neutrófilos e a posterior fagocitose dessas partículas libera para o tecido conjuntivo circunjascente enzimas como a β -glucoronidase, β -galactosidase, fosfatase ácida, mieloperoxidase estocadas nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, assim como catepsina ácida e lisozima localizadas nos grânulos pequenos ou secundários dessas células, capazes de destruir os componentes protéicos colagênicos, não colagênicos e proteoglicanas do tecido conjuntivo (HENSON^{94, 95}, 1971). Essas enzimas, outrossim, podem clivar o componente C5 do complemento, gerando fatores quimiotáticos potentes (C5a e Cb67), que propiciam o acúmulo de granulócitos neutrófilos e macrófagos ao redor da área necrótica central (PAGE; DAVIES; ALLISON¹⁶⁸, 1974; CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982).

Farmacologicamente, pode-se interferir no desenvolvimento dessa região, pois o recrutamento celular para ela pode ser inibida por antiinflamatórios não esteróides (indometacina, tenoxicam), esteróide (dexametasona) e citostático (metotrexato).

Na tentativa de explicar o efeito biológico desses fármacos vários mecanismos têm sido propostos. Admite-se que a diminuição do número dos receptores (Fc γ R2 e Fc γ R1.2) para a porção Fc da imunoglobulina-G (IgG), induzida pela dexametasona, impede a ligação dos imunocomplexos à superfície celular inibindo à sua fagocitose e reduzindo a síntese e secreção das enzimas lisossomais pelos neutrófilos e macrófagos. Tais efeitos reduziriam a inibição da destruição tecidual e o fluxo leucocitário (RUIZ et al.¹⁹⁵, 1991).

SALMON; SIMMONS; MONCADA¹⁹⁷, (1983) atribuem a redução do fluxo dessas células ao mecanismo redutor da síntese de LTB₄ pelos macrófagos induzido pela dexametasona. Outro mecanismo possível é a diminuição da síntese e secreção do peptídeo (IL-8), responsável pela ativação e quimiotaxia dos neutrófilos; e pela inibição da citocina indutora do fator quimiotático para neutrófilos de ratos (CINC), potente

reduzidor da aderência dos polimorfonucleares neutrófilos ao endotélio vascular (HIRASAWA et al.¹⁹², 1992; STANDIFORD et al.¹⁹³, 1992).

Outros efeitos redutores da transmigração celular atribuídos a dexametasona são a redução da síntese e secreção de metaloproteinases pelos polimorfonucleares neutrófilos, capazes de destruir a membrana basal das células endoteliais; bem como a inibição em nível transcricional das moléculas ICAM-1, reduzindo a aderência dessas as células endoteliais (ODA & KATORI¹⁶¹, 1992; VAN DE STOLPE et al.²⁴¹, 1993).

A redução do fluxo leucocitário causado pelo metotrexato envolveria um mecanismo diferente dos inibidores da lipó e ciclooxigenase, visto que o fármaco produz leucopenia decorrente da sua ação leucotóxica e efeito leucotático. Esse efeito foi constatado no processo inflamatório crônico induzido pela carragenina e adjuvante de Freund, quando o efeito do fármaco permaneceu acentuado durante todo o processo inflamatório agudo e na fase tardia do processo inflamatório crônico (EZ EAMUZIE & NJOKU⁵⁷, 1992).

Como a indometacina praticamente não interfere no fluxo leucocitário, uma vez que bloqueia a síntese de PGE₂ e TBX₂ sem inibir a produção do LTB₄ (LYN et al.¹³⁶, 1978), esse fármaco aumenta a produção do TNF não interferindo com a produção de IL-1 (KAWADA¹¹⁵, 1991), o mecanismo de adesão das células inflamatórias à parede endotelial não é comprometido, conseqüentemente, o fluxo leucocitário permanece inalterado. Além do que, essas citocinas, apresentam efeito sinérgico aumentando a produção da IL-8 pelos macrófagos, fibroblastos e linfócitos presentes no tecido granulomatoso. O mecanismo parece não envolver a participação da PGE₂, visto que a indometacina inibiu esse prostanóide sem influenciar a produção de IL-2, (TAKIGAWA et al.²²⁷, 1994).

Outros produtos sintetizados e secretados pelos macrófagos ativados, que interferem na migração dos neutrófilos e na formação da região central de necrose supurativa são as monocinas interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF). Tais citocinas induzem as células endoteliais à síntese das moléculas (ICAM-1, E-seletina) facilitadoras da transmigração celular. Também estimulam a produção pelos fibroblastos do fator ativador do plasminogênio, ativando as metaloproteinases latentes presentes no tecido conjuntivo, podendo, até mesmo, contribuir para o aumento do fluxo leucocitário, pois aumentam a destruição tecidual, gerando substâncias capazes de ativar o sistema do complemento à produção dos fatores quimiotáticos.

Recentemente, estudos realizados por KREFT et al.¹²¹ (1993) demonstraram que o derivado da indometacina obtido por substituição do radical metoxi por um anel quinolina (WAY-122,229) e o seu análogo (WAY-121,520), estruturalmente semelhantes ao ácido aracônico, poderiam inibir a fosfolipase A₂. Esses medicamentos, também, eram capazes de inibir a síntese dos leucotrienos (LTC₄ e LTB₄) em macrófagos e neutrófilos, possivelmente, por inativação da enzima 5-lipooxigenase (GLASER et al.⁸⁰, 1993).

A IL-1 e o TNF, ainda, perpetuam e amplificam a destruição tecidual, uma vez que autocrinamente podem estimular os macrófagos para a produção de PGE₂, de

proteínases neutras (elastase) e do TIMP (fator inibidor das metaloproteinases); e ativadoras dos fibroblastos para a produção das metaloproteínas latentes, capazes de degradar o colágeno dos tipos I, II, III, IV, V e VII, gelatinas, proteoglicanas, fibronectina e elastina; bem como para a produção do ativador do plasminogênio (PAGE¹⁷⁰, 1991). Comprovando o efeito daquelas citocinas (IL-1 e TNF). MEIKLE et al.¹⁵¹ (1989) e HEATH et al.⁹¹ (1982) verificaram que a IL-1 (1 ng/ml) após se ligar aos receptores da membrana dos fibroblastos, obtidos de pacientes com doença periodontal crônica, estimulava a síntese e secreção das metaloproteinases reduzindo o seu inibidor (TIMP) tecidual (QWARNSTROM et al.¹⁸⁰, 1988).

Com exceção dos neutrófilos, as demais células presentes no foco inflamatório não estocam metaloproteinases nem as produzem continuamente. A sua produção é dependente da ativação gênica por citocinas ligadas a receptores de membrana, sendo essa ativação regulada por fatores como a biodisponibilidade, a tradução e transcrição gênica, a conversão da forma latente para ativa da enzima e a inativação enzimática (PAGE¹⁷⁰, 1991).

Além da IL-1 e do TNF, o EGF e o PDGF participaram do processo da ativação gênica dessas enzimas. Por outro lado, o TGF por inibir transcrição gênica suprime a ativação delas. Também há evidências de que os produtos dos proto-oncogenes (c-fos e c-jun) participam do controle da sua ativação (aumentando ou diminuindo) gênica. Estudos *in vivo* indicam que a plasmina inicia a "cascata" de reações conversora da forma latente em ativa das proteinases (WIEHELM et al.²⁵⁵, 1989). *In vitro* foi demonstrado que a conversão envolve alterações conformacionais no centro catalítico das enzimas.

Muitas dessas enzimas como a collagenase, a gelatinase e a estreptolisina permanecem latentes no tecido conjuntivo, sendo ativadas em decorrência da liberação do fator ativador do plasminogênio pelos fibroblastos ativados por IL-1 e TNF- α . A ativação dessas enzimas produz destruição dos componentes teciduais, como: o colágeno dos tipos I, V, VII, proteoglicanas, fibronectina, laminina e elastina. Assim sendo, fármacos corticosteróides e as drogas citostáticas capazes de bloquearem essas citocinas, igualmente, inibem a ativação das metaloproteinases.

Outro efeito pró-inflamatório da IL-1 e do TNF- α é o estímulo à síntese da PGE₂ pelos macrófagos e fibroblastos (RICHARDS & RUTHERFORD¹⁸⁹, 1988). Por outro lado, SOMMERS & ERIKSON²¹⁵ (1993) demonstraram que a concentração elevada de PGE₂, por meio de um mecanismo dependente da concentração poderia inibir a transcrição gênica em RNAm para o TNF- α , via ativação da adenilciclase e aumento da concentração de AMPc. Portanto, fármacos antiinflamatórios não esteróides, que baixam a concentração do AMPc podem aumentar a produção do TNF- α .

Além dessas ações, o TNF- α individualmente ou associado ao INF- γ induz os macrófagos a um estado de ativação que determina o aumento da secreção de moléculas tóxicas como o peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. *In vitro* os produtos da

5-lipooxigenase induzem o aumento da síntese e secreção do TNF pelos macrófagos. *In vivo* esse efeito não foi confirmado, visto que os inibidores da lipooxigenase diminuíram a produção dos leucotrienos, aumentando, concomitantemente, a síntese e secreção TNF- α . Com base nesse último resultado, FERRANDIZ & FOSTER ⁶⁷ (1991) concluíram que os produtos da 5-lipooxigenase não participavam da regulação da produção de TNF.

Portanto, fármacos que estimulam a secreção da IL-1 e do TNF- α , como a indometacina, não interferem, ou até mesmo, podem aumentar o fluxo leucocitário (KUNKEL; CHENSUE; PHAN ¹²⁵, 1985). Por outro lado, medicamentos citostáticos como o metotrexato, que inibem a produção de citocinas como a IL-1 (BANNWART et al. ¹¹, 1994) e os fármacos corticóides (dexametasona) que bloqueiam a tradução e a transcrição gênica da interleucina-1, inibem o fluxo de neutrófilos, a produção e a ativação das metaloproteinases, bem como a secreção das substâncias tóxicas pelos macrófagos (DINARELLO ⁴⁹, 1987).

O TNF, IL-1 e os produtos bacterianos podem induzir os macrófagos a ativação da enzima óxido-nítrico-sintetase (ONs) à produção do óxido nítrico, um mediador químico de vida curta, que contribui para o aumento da atividade antimicrobiana e citotóxica dessas células (WANG et al. ²⁵⁰, 1993). Esse mediador interfere no metabolismo do ácido araquidônico pelos macrófagos peritoneais, uma vez que produz efeito dual dependente da concentração. Em alta concentração estimula a lipo e a ciclooxigenase, enquanto que em baixa concentração inibe a atividade dessas enzimas. Tais produtos conjuntamente com óxido nítrico causam vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular e o extravasamento plasmático (ROBISON & FORMAN et al. ¹⁹⁰, 1993).

O INF- γ interage sinergicamente com os lipopolissacarídeos (LPS) induzindo a síntese do RNA-m ONs (BOGDAN et al. ²⁰, 1993). Por outro lado, a dexametasona produz efeito inibitório da produção do óxido nítrico pelos macrófagos, pois ao impedir a produção do cofator tetrahidrobiopterina BH₄, necessário ao funcionamento daquela enzima, reduzindo a sua atividade. Esse fármaco quando associado ao 2-4-diamino-6-hidroxipirimidina apresenta o efeito inibitório da produção do óxido nítrico potencializado, visto que o efeito sinérgico desses fármacos impede o funcionamento tanto da GTP-ciclohidrolase como da óxido-nítrico-sintase, enzimas, diretamente envolvidas na produção do BH₄ e do ON (SCHOEDON et al. ²⁰⁵, 1993).

Recentemente, DRAKE et al. ⁵³ (1992) demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) estimuladoras da produção das moléculas de adesão (ICAM-1, ELAN-1), induzem as células endoteliais à secreção de uma substância com propriedades pró-coagulantes (α -trombina). Esta substância aumenta a aderência dos leucócitos polimorfonucleares na superfície endotelial e a contração do citoesqueleto dessas células, aumentando a permeabilidade vascular e a transmigração celular.

Esses autores, concluíram que os efeitos induzidos pela α -trombina era dependente de outros mecanismos, uma vez que no local da injeção de α -trombina,

posteriormente a administração de IL-1 causava o maior acúmulo de leucócitos polimorfonucleares do que no local da injeção de IL-1 seguida da injeção de histamina. Portanto, é plausível supormos que os antiinflamatórios esteróides e não esteróides produzam em relação à α -trombina efeito semelhante ao obtido com relação à IL-1.

O neuropeptídeo (substância P), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a interleucina 8 são outros mediadores químicos liberados no foco inflamatório capazes de potencializar a quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos, contribuindo para a formação da região central de necrose supurativa do granuloma (FAN et al.⁶¹, 1993).

O locus gênico de ativação da IL-8 encontra-se na região q12-21 do cromossoma 4. Várias citocinas, tais como: o fator estimulador de colônia (GM-CSF), a interleucina-2 (IL-2), o TNF- α produzidas pelas células sanguíneas, bem como as presentes no tecido conjuntivo promovem a ativação gênica daquela citocina. Igualmente, as endotoxinas de origem bacteriana são capazes de ativar monócitos, macrófagos e células endoteliais à produção da IL-8, que ao se ligar aos receptores seletivos para a IL-8 nos neutrófilos, semelhantes em número e afinidade aqueles para C5a ou fMet-Leu-Phe. A interação entre IL-8, IL-1, TNF e outros mediadores inflamatórios determina o extravasamento dos neutrófilos na região inflamada. Esse processo é controlado pela expressão das moléculas de adesão às células endoteliais (BICKEL¹⁸, 1993). Além da ação quimiotática, a substância p e o CGRP são capazes de estimular a mitogênese das células endoteliais, bem como produzir efeito vasodilatador em consequência da liberação de histamina pelos mastócitos (FOREMAN & JORDAN⁷⁰, 1983).

Com relação a esse último efeito, HIRASAWA et al.⁹⁸ (1992) demonstraram que a histamina influenciava tanto a permeabilidade vascular como a migração dos neutrófilos, apresentando efeito máximo em 24 horas. Entretanto, a ação de seus antagonistas (cimetidina e famotidina), por bloquearem os receptores H2 da histamina, aumentando a concentração local desse mediador, induziram o aumento da migração dessas células, não interferindo em relação ao aumento da permeabilidade vascular produzida pela histamina. Com base nesses efeitos, os autores concluíram que a histamina, agindo via ativação dos receptores H2 regula para baixo a migração dos neutrófilos. Em consonância com esse mecanismo, SWIETER et al.²²⁴ (1993) apesar de admitirem que a aderência celular a fibronectina não é propriamente estimulada pela histamina, as células aderidas a essa glicoproteína aumentaram drasticamente a produção de histamina.

No trabalho de HIRASAWA et al.⁹⁸ (1992), também, foi demonstrado que fármacos antiinflamatórios não esteróides como a indometacina agiram inibindo a migração dos neutrófilos, que foi atenuada pelos inibidores dos receptores H2, sugerindo que o fármaco possa se ligar a esses receptores. Também é possível que a indometacina por bloquear a síntese das prostaglandinas, não ativando a adenilciclase e reduzindo a produção do AMPc necessário à ativação da proteína quinase e a fosforilação da membrana ao redor dos grânulos dos mastócitos diminua a degranulação da histamina, dos fatores quimiotáticos e das proteases (COTRAN; KUMAR; ROBBINS³⁶, 1989).

Estudos *In vitro* realizados por SACERDOTE & PANERAI¹⁹⁶ (1993) demonstraram que anti-inflamatórios não esteróides (tenoxicam e a indometacina) reduziram a quimiotaxia induzida pela substância P e IL-8. Confirmando esse trabalho, estudos realizados na câmara de Boyden por HASCELIK et al.⁸⁸ (1994), comprovaram o efeito inibidor da quimiotaxia dos neutrófilos provenientes dos pacientes portadores de artrite reumatóide produzido pelo tenoxicam.

O sistema imune, influencia diretamente a quimiotaxia celular, pois como demonstraram TAKAHASHI et al.²²⁸ (1994), os produtos da secreção dos macrófagos, tais como: IL-1 β , TNF- α ou IFN- γ induzem a expressão das moléculas de aderência celular ICAM-1 nos fibroblastos e nas células endoteliais. IFN- γ , também, é capaz de estimular a expressão dos antígenos HLA-DR de imobilização dessas células. Além do que, a IL-6 e a IL-8 são, igualmente, capazes de potencializar a expressão de outras moléculas de aderência, tais como o LFA-3 e o antígeno CD44 nos fibroblastos. Tais moléculas são ligantes para os receptores autodirecionais presentes nos linfócitos T circulantes.

É necessário, também, mencionarmos a interação entre os macrófagos e os linfócitos presentes no foco inflamatório. A síntese e secreção das enzimas lisossomais pelos macrófagos ativados acentua a destruição tecidual, estimulando a quimiotaxia celular (CATANZARO GUMARÃES²⁷, 1982). Tanto os linfócitos B como os linfócitos T podem gerar produtos biologicamente ativos (linfocinas) capazes de ativar os macrófagos (PAGE; DAVIES; ALISSON^{168, 169}, 1974). Além do mais, os anticorpos (IgG e IgM) produzidos pelos linfócitos B, ao ligarem-se aos antígenos bacterianos formam imunocomplexos que induzem os macrófagos à secreção das enzimas hidrolíticas. Igualmente, os linfócitos T auxiliares (Th1 e Th2) produzem citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) diretamente relacionadas às respostas imunes humoral e celular capazes de influenciarem a atividade dos macrófagos (MANHART et al.¹⁴⁰, 1994).

Por outro lado, os macrófagos, também, possuem receptores para Fc da IgE e alérgenos específicos ou IgE e anti-IgE, estrutural e funcionalmente diferentes dos receptores tipo IgE presentes nos mastócitos e basófilos, que ao serem ativados, induzem à liberação dos mediadores químicos moduladores das respostas imune humoral e celular, associado ao processo inflamatório (TAMAOKI et al.²²⁸, 1991). Tais células, quando ativadas, produzem IL-1 estimulando os linfócitos T auxiliares à produção da IL-2. Concomitantemente, causa a ativação das fosfolipases de membrana resultando na hidrólise dos glicolipídios contendo inositol em dois segundos mensageiros: diacilglicerol que ativa a fosfolipase C e o inositol fosfato que estimula a secreção de cálcio, ativando a proteína quinase K iniciadora de vários processos celulares, dentre os quais a produção do ácido araquidônico (SCULLY²⁰⁷, 1982).

A inibição dos produtos derivados do metabolismo desse ácido resultou na inibição da enzima guanilato ciclase e na conseqüente proliferação dos linfócitos, em decorrência da baixa concentração do GMPc. Com o aumento da produção da IL-2 ocorre a

proliferação dos linfócitos T antígenos específicos e a secreção de γ -interferon (γ -INF) ativando as respostas imunes mediada por células e dependente do anticorpo. (UTSUGI & FIDLER²³⁸, 1991).

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que os macrófagos, quando cultivados em presença dos linfócitos T, estimulavam a produção da IgA e da IgE pelos linfócitos B (RUBINSTEIN et al.¹⁹⁴, 1993). Pois, essas células ao ativarem os linfócitos T auxiliares induzem a liberação de linfocinas (IL-4, IL-5), respectivamente, necessárias à proliferação e a completa diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e células de memória. Por outro lado, as células B podem produzir PGE2 capaz de funcionar como imunoregulador, inibindo a produção e a expressão do receptor para IL-2, resultando na proliferação dos linfócitos T. Já, a produção da IL-4 e da IL-5 pelas células T auxiliares tem se mostrado resistente ao efeito inibidor da PGE2 (HARREL & STEIN⁸⁵, 1995).

Comprovando, ainda, a importância da relação existente entre os macrófago e as células do sistema imune, citamos o fato de que na ausência dos macrófagos, os inibidores da ciclooxigenase apresentam pouca ou nenhuma ação em relação à proliferação dos linfócitos T (FARRAR & HUMES⁸², 1980). Contudo, apresentam acentuada importância no controle da produção das imunoglobulinas pelos linfócitos B.

HARREL & STEIN⁸⁵ (1995) demonstraram que a PGE2, em alta concentração, causa o decréscimo na produção da IgG, enquanto que em baixa concentração produz significativo aumento da produção de IgG capaz de formar imunocomplexos com os anticorpos circulantes, exacerbando a destruição tecidual por imunocomplexos, a ativação do complemento, a degranulação dos neutrófilos e a produção do ânion superóxido e de outros produtos tóxicos derivados do oxigênio.

A propósito da geração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos neutrófilos foi demonstrado que medicamentos antiinflamatórios não esteróides como o tenoxicam, por meio de um mecanismo não competitivo podem diminuir a sua produção, visto que esse fármaco inibe a formação do radical superóxido (O_2^-) por neutrófilos estimulados com metionil-leucil-fenilalanina (MLP), ion cálcio e soro tratado com zymosan (COLLI et al.³⁴, 1991).

Outros metabólitos secretados pelos neutrófilos e macrófagos, via lipooxigenase como o ácido hidroperoxieicosatetranoico (15 HPETE) e o LTB_4 , também, são capazes de controlar a resposta imune celular, pois agem tanto estimulando a proliferação das células T citotóxicas/supressoras, bem como inibindo a proliferação das células T indutoras/auxiliares (GUALDE; DURASFRISOJORO; GOODWIN⁸³, 1985). Ainda, medeiam a produção de INF- γ aumentando a atividade das células NK (SHAMSUDDIN; HSUEH; SMITH²⁰⁹, 1992).

Devemos, também, ressaltar a importância dos LC_4 e LD_4 na ativação dos macrófagos à secreção das enzimas lisossomais, e na dependência dos produtos da ciclooxigenase, a sua influência na ativação dos linfócitos T (FEUERSTEIN; FOEGH; RAMVELL⁸⁸, 1981). Esses últimos produtos, quando presentes, estimulam a atividade das células T supressoras. Contudo, quando bloqueados pela indometacina ativam as células T auxiliares (ROLA-PLESZCZYNSKI & LEMAIRE¹⁹¹, 1985).

Portanto, fármacos como a dexametasona que reconhecidamente bloqueiam tanto a lipooxigenase como a ciclooxigenase diminuindo a concentração local dos seus produtos metabólicos no foco inflamatório, inibem a proliferação dos linfócitos T e a produção de IgG, IgM, e IgA produzindo imunossupressão. Por outro lado, fármacos inibidores da ciclooxigenase estimulam a atividade das células NK, provavelmente, por suprimirem a produção da PGE_2 (FOWLES et al.⁷¹, 1993).

O metotrexato é um outro fármaco com propriedade imunossupressora que interfere na relação macrófago/sistema imune. Entretanto, por meio de um mecanismo diferente dos inibidores da lipo e ciclooxigenase, uma vez que é citotóxico para os linfócitos. BANNWARTH, B. et al.¹¹ (1994) demonstraram que os poliglutamatos derivados do metotrexato podem inibir várias enzimas, dentre as quais: a dihidrofolato redutase, cuja atividade é necessária ao elevado grau de proliferação celular e a rápida renovação do RNA dos leucócitos; e, a 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleotídeo-transformilase, por aumento da concentração de dihidrofolato poliglutamato (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD³⁹, 1993).

Em patologias em que a haja acentuada participação do sistema imunológico, o metotrexato pode agir como um agente antiinflamatório de ténue efeito imunomodulador (BANNWARTH et al.¹¹, 1994). Possivelmente, esse efeito pode ser explicado com base no trabalho de WILLIAMS; TOPLEY; WILLIAMS²⁵⁶ (1994), que ao estudarem o mecanismo de ação do metotrexato (MTX) e de três de seus derivados lipofílicos (MTX-LIPO), na atividade secretora dos macrófagos, verificaram que esses fármacos, quando empregados em concentração não tóxica, MXT(2.5 nmo/10(5) cels.) e MTX (5.6 nmo/10(5) cels.), não inibiram a secreção da PGE_2 e $TNF-\alpha$ pelos macrófagos.

Apresenta, também, efeito antiflogógeno dependente da concentração (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD³⁹, 1993), pois ao inibir a produção do ácido N^{10} -formiltetraidrofolico necessário à formação do ribonucleotídeo 5-formamidoimidazol-4-carboxamida, promove o acúmulo intracelular de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo, estimulando a produção local de adenosina, que por sua vez aumenta a concentração do AMPc inibindo a produção da acetilcoA a partir do piruvato e, conseqüentemente, o ciclo do ácido cítrico, a fosforilação oxidativa e a produção de ATP, fonte de energia para o processo da fagocitose por macrófagos e neutrófilos.

Os produtos da ciclooxigenase como a PGE_2 desempenham papel importante tanto na regulação da resposta imune humoral como celular, interferindo na relação macrófago/sistema imunológico, uma vez que ativam a adenilciclase elevando o nível

intracelular do AMP_c, inativando os macrófagos e suprimindo a diferenciação das células B e a mitogênese das células T, diminuindo a produção de anticorpos e a citotoxicidade mediada por células (SHULTZ et al.²⁰⁶, 1979; LIM et al.¹³⁰, 1983; SCHENKELAARS & BONTA²⁰³, 1986; OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993).

Na resposta imune humoral, a alta concentração PGE₂ reduz a produção de anticorpos, por meio de um efeito direto nos linfócitos B ou indireto nos linfócitos T auxiliares. Na resposta celular, ativa os linfócitos T supressores, inibindo a proliferação da população linfocitária restante, bem como a citotoxicidade dependente do anticorpo e das células NK (WEBB & NOWOWIEJSKI²⁵⁴, 1978).

Portanto, antiinflamatórios não esteróides (NSAIDs) como a indometacina e o tenoxicam, por regularem para baixo o efeito da PGE₂ na produção espontânea de IgG podem atenuar a destruição tecidual. O mecanismo envolvido no efeito desses fármacos é a inibição da ciclooxigenase 1, enzima expressa constitutivamente em muitas células, capaz de regular o metabolismo do ácido araquidônico requerido para a produção das imunoglobulinas (HARREL & STEIN⁸⁵, 1995).

Como as prostaglandinas inibem o aumento do número dos monócitos, a expressão dos antígenos de superfície, a produção do TNF e a secreção das enzimas lisossomais pelos macrófagos, é possível que fármacos inibidores da ciclooxigenase como a indometacina aumentem a citotoxicidade celular, em decorrência da ativação dos macrófagos causada pela inibição da PGE₂, diminuição do AMP_c e secreção das enzimas lisossomais (SCHULTZ et al.²⁰⁶ 1979), bem como pelo aumento da produção TNF- α . Em consonância com esse estudo FIEREN et al.⁶⁹ (1992), *In vitro*, demonstraram que a adição de PGE₂ exógena, mediante efeito dependente da dose, causava o decréscimo da produção do TNF- α .

Fármacos corticosteróides como a dexametasona produzem elevação do estado de ativação das células Natural killer (NK), em decorrência da supressão da produção da PGE₂ pelos macrófagos. Por outro lado, inibem a atividade fagocitária dos macrófagos, bem como diminuem a produção dos anticorpos IgG e IgM pelos linfócitos (FOWLES et al.⁷¹, 1993).

Portanto, considerando que a indução do estado de ativação dos macrófagos está inversamente relacionado aos produtos metabólicos da ciclooxigenase, SCHENKELAARS & BONTA²⁰⁴ (1983) sugeriram que a diminuição da produção das prostaglandinas e tromboxana pelos fármacos antiinflamatórios inibidores da ciclooxigenase ativa os macrófagos a liberação das enzimas lisossomais.

Em consonância com esse estudo, RADDASSI et al.¹⁸¹ (1991) demonstraram que esses prostanóides não eram essenciais para o processo da ativação dos macrófagos, tendo a indometacina sido efetiva na manutenção da atividade antineoplásica apresentada pelos macrófagos estimulados com LPS ou LPS e INF- γ . Com a adição de PGE₂ exógena, na cultura, ocorreu a inativação dessas células. Sendo assim, é possível

que os produtos metabólicos resultantes da ativação da ciclooxigenase disparem o "gatilho" da via de desativação dessas células. Por outro lado, apesar dos inibidores da síntese das prostaglandinas restaurarem o estado de ativação dos macrófagos, eles não potencializaram a resposta imune celular (UTSUGI & FIDLER²³⁸, 1991).

Quando o agente flogógeno não é inerte e interage com os macrófagos estimulando a sua atividade secretora e o seu contínuo recrutamento para a área de inflamação, induz a formação de granulomas de alto índice de renovação celular (CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982). A liberação dessas enzimas no foco inflamatório crônico produz destruição tecidual, gerando fatores estimuladores da proliferação dos monoblastos (fator estimulador de colônia (CSF), IL-3), que, agindo na medula óssea, determinam o contínuo recrutamento dessas células para a área da inflamação crônica (VAN FURTH²⁴², 1975).

Outras enzimas produzidas e secretadas pelos macrófagos ativados como as proteases neutras (elastases e collagenases), ao destruírem os componentes teciduais ativam o fator XII (Hageman) da coagulação, iniciando os sistemas fibrinolítico e do complemento. Em decorrência disso, geram-se substâncias como: a α -trombina, PDGF, PF4, fragmentos C₅ e hFpB (fibrinopeptídeos) com propriedades quimiotáticas e mitogênicas, assim como mediadores vasoativos como C3a, C5a e bradicinina (ROBBINS et al.¹⁸⁹, 1989).

A ativação do sistema fibrinolítico pode ser inibida KIRCHHEIMER¹¹⁸ (1993) pela ação de medicamentos antiinflamatórios não esteróides (tenoxicam), que diminuem o número de receptores uroquinase do tipo ativador do plasminogênio nos macrófagos, bem como por antiinflamatórios esteróides (dexametasona), que, *in vitro*, quando adicionada na cultura de macrófagos ativados com tioglicolato, causam a redução do fator ativador do plasminogênio, comparativamente ao grupo controle (KUNG & LAU¹²⁴, 1993).

Em relação à bradicinina NAKAJIMA et al.¹⁵⁵ (1994) demonstraram que a resposta inflamatória, por ela induzida, envolvia a participação dos receptores B₂ para esse mediador, sendo, também, parcialmente mediada pela taquiclinina secretada pelos nervos sensitivos terminais. Ela induz a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Como a indometacina não impediu o extravasamento plasmático, os autores concluíram que os produtos resultantes da ativação da ciclooxigenase não participavam ativamente desse processo.

Esse mediador, também, apresenta efeito na proliferação celular. Em consonância com esse efeito, McALLISTER et al.¹⁴⁶ (1995) demonstraram que a bradicinina, possivelmente, por meio de um mecanismo que produz o aumento da concentração intracelular de AMPc, via bloqueio da proteína quinase, inibia a síntese do DNA e a transição da fase G₁ para S do ciclo celular, inibindo a resposta proliferativa induzida por EGF e PDGF, de maneira que a indometacina bloqueou o efeito inibitório da bradicinina na síntese de DNA.

Dos produtos gerados pelos sistemas do complemento, da coagulação e fibrinolítico, o hFpB destaca-se por sua propriedade quimiotática para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Apesar desse efeito equívoco em potência ao produzido pelo componente 5 do complemento (C5a), leucotrieno B₄ (LTB₄) e formil-metionil-fenilalanina (fMLP), o sítio de ligação do hFpB envolve receptores diferentes dos ocupados por aqueles mediadores (KREISLE & PARKER¹²⁰, 1983; WILLIAMS et al.²⁵⁷, 1987). Além do mais, como o hFpB não instiga a secreção pelos polimorfonucleares neutrófilos das enzimas lisossomais, o estímulo quimiotático por ele gerado pode envolver outros mecanismos de quimiotaxia (SENIOR et al.²⁰⁸, 1986).

Além da destruição tecidual provocada pela liberação das enzimas lisossomais, as fosfolipases em decorrência da produção dos mediadores químicos ativadores dos sistemas enzimáticos relacionados ao metabolismo do ácido araquidônico, também, são capazes de potencializar o processo inflamatório crônico (PAGE¹⁷⁰, 1991). Dentre esses, destacam-se as substâncias potencializadoras (leucotrienos e prostaglandinas) do recrutamento leucocitário para o foco inflamatório. O efeito desses mediadores pode ser comprovado nos estudos de HIGGS; FLOWER; VANE⁹⁷ (1979) e de SALMON; SIMMONS; MONCADA¹⁹⁷ (1983), nos quais fármacos (corticosteróides) inibidores da ciclooxigenase e lipooxigenase reduziram a migração leucocitária.

O TGF- β induz a quimiotaxia de praticamente todos os tipos celulares, por meio de um mecanismo direto. Esse fator de crescimento, indiretamente, também, pode potencializar o efeito quimiotático, mediante a expressão do gene da integrina leucocitária $\alpha_5\beta_1$ e dos receptores de superfície (VLA-5), que aumentam a adesividade dessas células para a fibronectina. Associado a esses efeitos, o TGF- β por estimular a produção da collagenase e da gelatinase destruindo o colágeno tipo IV, facilita a migração celular através da matriz. Além do mais, fatores de crescimento, tais como o TGF- β liberados no tecido inflamado aumentam a expressão de receptores para Ig (Fc-RIII, CD16) capazes de aumentar a atividade fagocitária dos macrófagos e a secreção dos radicais livres (WAHL et al. ²⁴⁸, 1993).

O fator ativador das plaquetas (PAF) é um fosfolípido, também produto pelos macrófagos ativados, que por sua propriedade pró-coagulante participa ativamente do processo inflamatório, seja ele associado ao processo do reparo ou ao desenvolvimento dos processos inflamatórios crônicos granulomatosos. Ao ativar os seus receptores localizados em várias células e tecidos, promove a quimiotaxia, a agregação, a secreção das enzimas lisossomais, o metabolismo do ácido araquidônico e a produção do ânion superóxido por polimorfonucleares neutrófilos; a agregação e a fagocitose dos macrófagos; a ativação dos eosinófilos; e o aumento da permeabilidade vascular. Além do que, pode agir sinergicamente com outros mediadores inflamatórios cuja produção foram por ele induzida, estimulando o recrutamento e a quimiotaxia das células inflamatórias (RASCH et al. ¹⁸⁶, 1995).

Os neutrófilos, as células endoteliais, os basófilos, as plaquetas e os linfócitos são, igualmente, capazes de produzi-lo. Como a ativação desse autacóide é mediada pela enzima Proteína quinase C, sendo inativado pela enzima PAF-acetilhidrolase (PAF-AH) (KUCEY, CHEUNG, ROTSTEIN¹²³, 1992), é possível que fármacos antiinflamatórios esteróides como a dexametasona que agem inibindo a proteína quinase C e aumentando a produção da PAF-AH, impeçam a sua ação (NARAHARA; FRENKEL; JOHNSTON¹⁵⁴, 1993).

BEUSENBERG et al.¹⁶ (1991) demonstraram que o PAF age nos macrófagos alveolares ativados estimulando a adenilciclase para uma resposta bifásica dependente da dose. Em alta concentração inibe a adenilciclase diminuindo o nível intracelular de AMPc, enquanto que em baixa concentração, estimula a atividade enzimática aumentando o nível do AMPc. O mecanismo envolvido indica a modulação pelos produtos do ácido araquidônico, visto que medicamentos antiinflamatórios como a indometacina e a dexametasona podem reverter tanto a inibição como a estimulação da adenilciclase induzida pelo PAF.

Quanto ao papel dos nucleotídeos cíclicos no mecanismo de secreção das enzimas hidrolíticas pelos macrófagos, os resultados ainda são controversos (LEONI et al.¹²⁹, 1985). Entretanto, é plausível que os produtos metabólicos da ciclooxigenase como a PGE₂ e PGI₂ estimulem a adenilciclase e o aumento do nível intracelular do AMP cíclico, inibindo a secreção de enzimas lisossomais por macrófagos (LIM et al.¹³⁰, 1983; BONTA et al.²², 1984).

Devemos, ainda, ressaltar, o papel desses nucleotídeos no controle da proliferação celular. O aumento intracelular do AMP cíclico inibe a proliferação celular pela manutenção do estado diferenciação celular (CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982). *In vivo*, pode-se comprovar a ação desses nucleotídeos, por meio da inibição da proliferação celular do melanoma B-16, mediante a administração da PGA₁, com o conseqüente aumento da concentração intracelular do AMP cíclico (FAVALI et al.⁶³, 1980). Efeito semelhante, também, foi obtido administrando-se dibutilil-AMP cíclico. Confirmando esses resultados, estudos *in vitro* demonstraram que a adição da PGE₂ na cultura das células neoplásicas, estimulava por meio da sua ligação a proteína G, via ativação da adenilciclase, o aumento da produção de AMP cíclico inibindo a proliferação celular (FRIEDMAN et al.⁷³, 1976).

Nas lesões crônicas granulomatosas, o mecanismo envolvido na produção das prostaglandinas está diretamente relacionada com ligação dos lipopolissacarídeos com receptores glicoprotéicos de 55 kD para o complexo lipopolissacarídeo e proteína de ligação (LPS/LBP). A ativação desses receptores causa o aumento da síntese da PGE₂ e de IL-1 e TNF- α pelos macrófagos capaz de estimular os fibroblastos à produção do PGE₂ elevando a concentração local desse prostanóide (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993).

A relação entre a produção de prostaglandinas, o nível de AMPc e o estado de ativação dos macrófagos, pode ser demonstrada com a administração dos fármacos

inibidores da ciclooxigenase. Esses medicamentos promovem inibição da síntese de prostaglandinas, diminuição do nível intracelular de AMPc e a ativação dos macrófagos, identificada pelo aumento da síntese e secreção de enzimas lisossomais e de outros produtos biologicamente ativos. Esse estado de ativação, também, é obtido com o emprego dos produtos da lipooxigenase. Confirmando esses estudos, SCHENKELAARS & BONTA²⁰³ (1986) demonstraram que fármacos inibidores da ciclooxigenase produziram o aumento da concentração intracelular de LTB₄, promovendo a ativação dos macrófagos e a síntese e secreção das enzimas lisossomais.

As prostaglandinas participam do controle da proliferação e da diferenciação celular, sendo a sua ação dependente da estrutura molecular, da dose e do modelo experimental empregado. Confirmando esse efeito, JAFFE & SANTORO¹⁰⁸, (1977), HONN; BOCKMAN; MARNETT¹⁰² (1981) e SANTORO et al.²⁰⁰ (1986) demonstraram que as prostaglandinas das séries A, D e E inibiam a proliferação celular em vários modelos experimentais (cultura de células leucêmicas), e as da série E e A aumentavam a diferenciação celular em leucemias e linfomas, bem como participavam do controle da proliferação e diferenciação das células precursoras eritróides.

Com base nesses estudos, é plausível que fármacos inibidores da ciclooxigenase como a indometacina apresentam efeito proliferativo, visto que inibem a síntese de prostaglandinas diminuindo o nível intracelular do AMPc. Dando suporte a esse mecanismo citamos o trabalho de FAVALLI et al.⁶³ (1980), no qual a inibição da biosíntese das PGs resultou na estimulação da proliferação celular. Nesse estudo, os autores verificaram o efeito estimulador da proliferação celular pela indometacina.

Em consonância com o trabalho da FAVALLI et al.⁶³ (1980); SANTORO et al.¹⁹⁹ (1976) demonstraram que a hidrocortisona adicionada a cultura de células neoplásicas determinava o estímulo da proliferação celular. Tais trabalhos corroboram o efeito antiproliferativo das PGs. Todavia, é possível que a inibição de alguns tipos de neoplasias malignas pelos fármacos antiinflamatórios não esteróides seja causada pelo efeito imuno-estimulador desses medicamentos, visto que as PGs induzem o aumento da população celular supressora da resposta imune (WEBB & NOWOWIEJSKI²⁵⁴, 1978).

Esse efeito foi confirmado pelo trabalho de SUZUKI et al.²²³ (1994) que estudando *In vivo* o efeito da indometacina (5mg/kg/dia) na atividade dos macrófagos. Em relação ao crescimento do melanoma B16, constataram o estímulo da citotoxicidade dos macrófagos peritoneais com a conseqüente diminuição do crescimento da neoplasia. Entretanto, o mecanismo pelo qual produzem este efeito até então era controverso.

Um dos mecanismos propostos é que as prostaglandinas ativariam a enzima adenilciclase elevando o nível intracelular do AMPc, tendo como conseqüência a inibição da proliferação celular (ADOLPHE et al.¹, 1973; NASEEM et al.¹⁵⁷, 1973). Em consonância com esses estudos, JHONSON & PASTAN¹⁰⁹ (1971) demonstraram que as PGE₁ e PGD₁ inibiam a proliferação dos fibroblastos via ativação da adenilciclase e aumento da concentração

intracelular do AMPc. Por outro lado, HUGHES-FULFORD¹⁰⁴ (1989) demonstrou que as prostaglandinas inibem a fase de síntese (S) do ciclo celular por meio de um mecanismo dependente da sua concentração e totalmente independente do AMPc.

Esse mecanismo envolveria a participação do anel ciclopentano das prostaglandinas capaz de inibir a síntese de proteínas reguladoras do ciclo celular, como a ciclina produzida no núcleo das células normais que se encontram no ciclo mitótico e células neoplásicas, estando relacionada com a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. KOSAKA et al.¹¹² (1993) estudando o mecanismo de inibição da proliferação das células endoteliais, postulou que o mecanismo envolveria a ativação da proteína quinase C, resultando na inibição do ciclo celular decorrente da supressão do gene de transcrição da ciclina A.

A síntese de prostaglandinas, também, está envolvida em muitos outros aspectos do desenvolvimento das doenças inflamatórias crônicas. Em particular, na mediação local da osteólise presente na doença periodontal e nas lesões granulomatosas periapicais. As prostaglandinas, mais especificamente, a PGE₂ tem sido constatada em cultura de células removidas dessas lesões (HARVEY⁸⁸, 1989). Esse prostanóide, conjuntamente com IL-1, IL-4, TNF- α , TGF- α , LIF e CSFs participa ativamente do processo da reabsorção óssea induzido por essas lesões (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992).

Os macrófagos e as demais células presentes no infiltrado inflamatório estão diretamente relacionados ao processo da reabsorção osteoclástica, pois muitos dos seus produtos de síntese e secreção como: a IL-1, PGs, TNF e os fatores de crescimento, conjuntamente com as citocinas produzidas pelas demais células presentes no tecido inflamado, principalmente, a proteína relacionada ao hormônio paratireoideano (PTHrP) participam ativamente do controle do processo osteolítico local (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992).

Os macrófagos sintetizam e secretam outros agentes biologicamente ativos, tais como: os componentes das vias clássica e alternada do complemento, substâncias mediadoras da destruição das células tumorais e estimuladoras da secreção de enzimas lisossomais (FERLUGA et al.⁶⁶, 1976); substâncias com propriedades antiviral, antineoplásica e imunoreguladora (interferon- γ); e, monocinas (IL-1 e TNF) estimuladoras da angiogênese, da proliferação fibroblástica e da síntese do colágeno.

Em relação à síntese de colágeno, OEGEMA et al.¹⁸² (1975) demonstraram que a organização das fibrilas colágenas poderia ser influenciada pela quantidade e o tipo de proteoglicana tecidual. Pelos estudos de WOOD²⁵⁹ (1980) foi demonstrado que o condroitin-4-sulfato, o condroitin-6-sulfato e o queratam sulfato aceleram a formação das fibras colágenas, enquanto que o ácido hialurônico e o dermatam sulfato não apresentaram qualquer efeito. Ressaltando a importância das proteoglicanas e glicoaminoglicanas, em relação à produção das fibras colágenas, NORTON & BURSTONE¹⁸⁰ (1989) relataram que elas influenciavam a fibrillogênese das fibras colágenas, a força tensil e o diâmetro dessas fibras. Nesse estudo, igualmente, foi

demonstrado que esses componentes da matriz extracelular aumentavam a estabilidade térmica protegendo contra a digestão colagenolítica.

O ácido hialurônico é um componente da matriz extracelular, cuja produção pelos fibroblastos é estimulada por citocinas como a IL-1 e o PDGF. Participa ativamente da formação dos granulomas inflamatórios, pois juntamente com a fibronectina e a fibrina forma a matriz sobre a qual ocorre a migração celular. Além do mais, os produtos da sua metabolização regulam a degradação (fragmentação) da fibrina, proporcionando espaço para as células migrarem em direção ao tecido granulomatoso, como é o caso das células endoteliais, cuja migração está inversamente relacionada à presença do hialuronidato. Também estimula a fagocitose, a aderência e a quimiotaxia dos leucócitos (NORTON & BURSTONE ¹⁶⁰, 1989).

Portanto, o efeito inibidor da formação dos componentes da matriz extracelular e a conseqüente diminuição da migração celular, da formação do tecido de granulação e das fibras colágenas apresentado pelos fármacos antiinflamatórios esteróides e não esteróides pode ser um outro mecanismo envolvido na inibição da formação do tecido granulomatoso.

Considerando que substâncias como a heparina e o ácido desoxiribonucleico, em baixa concentração, diminuíram a formação das fibras colágenas, de modo que quando formadas, apresentavam-se maiores do que as originadas na ausência dos glicosaminoglicanas ou em presença do: condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato ou queratam sulfato (OEGEMA et al.¹⁶² 1975), é possível que fármacos citostáticos como o metotrexato que reconhecidamente inibem a síntese do DNA produzam esse mesmo efeito. Além do que, também é possível que fármacos como o metotrexato ao diminuírem a produção de metionina, inibam a oxidação e a hidroxilação de resíduos específicos de aminoácidos necessários à formação das fibras colágenas.

Os fibroblastos presentes no foco inflamatório também são capazes de sintetizar e secretar substâncias biologicamente ativas como o fator de crescimento indutor da proliferação dos macrófagos. Esse efeito pode ser comprovado *in vitro* adicionando-se na cultura de macrófagos produtos secretados pelos fibroblastos. Por outro lado, o estudo de DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN.⁴⁸ (1982) demonstrou a capacidade dos fatores de crescimento (FGF, TGF- β , EGF, PDGF, IGF, IL-1 e TNF) de origem macrofágica em estimular a síntese de DNA e a proliferação fibroblástica. Dentre estes fatores, ressalta-se, a importância do fator de crescimento fibroblástico (FGF), por sua capacidade de estimular as células endoteliais a proliferar e a sintetizar componentes da matriz extracelular como a fibronectina e vários tipos de colágeno (GOSPODAROWICZ & ILL ⁸¹, 1971). Esse efeito pode ser constatado *in vivo* pelo aumento da vascularização do tecido de granulação, formado dentro da esponja contendo o FGF implantada no tecido subcutâneo dos ratos (PATT & HOUCK,¹⁷⁴ 1983).

Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de esclarecer o mecanismo envolvido na relação macrófago/fibroblasto DeLUSTRO; SHERER; LeROY ⁴⁶ (1980) ao

constatarem que os fatores do crescimento fibroblástico podiam ser identificados no soro fetal de bezerros diluído à 10%, submetido a tratamento com indometacina, concluíram que o mecanismo não era mediado pelas prostaglandinas.

Mas, sim, devido ao estímulo pelo fármaco à produção de IL-1 e do FGF. Portanto, o aumento da secreção desses fatores interfere diretamente no processo de fibrosamento dos granulomas inflamatórios, pois estimula a produção das fibras colágenas (PAGE 170, 1991). Entretanto, como a indometacina em altas concentrações, também, inibe a produção da fibronectina pelos macrófagos, possivelmente, ela possa retardar o processo de fibrosamento dessas lesões, visto que essa glicoproteína conjuntamente com a fibrina e o ácido hialurônico forma a matriz sobre a qual ocorre a migração das células produtoras do colágeno. O mecanismo envolvido parece não estar relacionado com a alta concentração de prostaglandinas, uma vez que a baixa concentração de indometacina causou um efeito mínimo em relação à redução da síntese de fibronectina pelos macrófagos (SMITH et al. 214, 1991).

DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN 48 (1982) postulou que o efeito dos corticosteróides na atividade fibroblástica ocorria indiretamente, ou seja, agiriam nos macrófagos inibindo a secreção dos fatores de crescimento (IL-1, TNF- β), necessários ao início da fibrogênese. O mecanismo de ação desses fármacos impediria a transcrição e a tradução dos genes responsáveis pela produção dessas citocinas, inibindo a síntese das fibras colágenas (PAGE 170, 1991). A inibição da produção do LTB₄ e do LTD₄ é um outro mecanismo envolvido no efeito anticolagênico desse medicamento, visto que esses leucotrienos são estimuladores da produção da IL-1 (ROLA-PLESZCZYNSKI & LEMAIRE¹⁹¹, 1985).

Considerando que o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) apresenta importante função no processo inflamatório, regulando atividade fibrótica, uma vez que é quimiotático para monócitos e fibroblastos, haja visto que os corticosteróides (dexametasona) modulam, nos macrófagos, a ativação gênica do PDGF, em decorrência do aumento do RNA-m necessário à sua produção, HAYNES & SCHAW⁸⁷ (1992) sugeriram a possibilidade desse mecanismo de ação estar relacionado ao controle da fibrogênese pelo fármaco.

Contrariamente, os inibidores da ciclooxigenase (indometacina, piroxicam, buprofem), que reconhecidamente não reduzem a produção do LTB₄ e da IL-1, agem nos macrófagos aumentando a produção do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) estimulando a síntese das fibras colágenas (ESTES et al.⁶⁰, 1984). Por outro lado, é possível que outros antiinflamatórios não esteróides como o diclofenaco sódico reduzam a formação do ácido aracdônico disponível, ou então, como o tenoxicam, que por diminuir a concentração o oxigênio livre no local da inflamação, possa diminuir a metabolização desse ácido. Além do mais, também, admite-se que esse último fármaco e o naproxeno inibam a produção da IL-1 (TATAKIS²³⁰, 1993).

Além da relação entre macrófagos e fibroblastos, também, admite-se a participação da resposta imune no controle da atividade dessas últimas células. Dependendo do estado de ativação e das condições experimentais, os linfócitos T sintetizam e secretam linfocinas capazes aumentar ou diminuir a proliferação dos fibroblastos e a síntese do colágeno (NEILSON; PHILLIPS; JIMENEZ¹⁵⁸, 1982). Os macrófagos não ativados e os linfócitos T secretam fatores inibidores da proliferação fibroblástica (RAINE; TRAUGOTT; STONE¹⁸⁵, 1971). Contrariamente, PATERSON & HARVIN¹⁷³ (1953) demonstraram que os linfócitos T antígeno-reativos secretam linfocinas estimuladoras da proliferação dos fibroblastos e da síntese do colágeno (FGF).

Os macrófagos, igualmente, têm participação na indução da angiogênese necessária à formação do tecido granulomatoso. Nesse processo, participam substâncias de natureza peptídica (fatores de crescimento), que ao se ligarem aos receptores específicos (proteína G, tirosina quinase), induzem a sua fosforilação e das proteínas intracelulares capazes de funcionar como mensageiros secundários, ativando fatores de transcrição, ou então, aumentando a transcrição gênica e desencadeando o início da proliferação das células endoteliais (ROTHER & FALANGA¹⁹³, 1992).

Os efeitos produzidos por esses fatores podem ser tanto autócrinos (na mesma célula que o produz) como parácrinos (células vizinhas). Entretanto, é preciso esclarecer que a sua ação é bastante complexa e dependendo da presença de outros peptídeos, o fator de crescimento poderá induzir, em uma determinada célula, atividades estimuladoras ou inibidoras. Exemplificando, *in vitro*, o fator beta transformador do crescimento (TGF- β) poderá estimular tanto a proliferação dos fibroblastos, em presença do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), como na presença do fator de crescimento epidérmico (EGF), inibir a proliferação dessas células (ROTHER & FALANGA¹⁹³, 1992).

Dentre os fatores de crescimento capazes de induzir a angiogênese, MAISEL & HOLM¹⁴¹ (1992) citam: o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator beta transformador do crescimento (TGF- β), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Desses, por sua acentuada atividade angiogênica, destacam-se, particularmente, o PDGF, IGF-1 e o VEGF (NICOSIA; NICOSIA; SMITH¹⁵⁹, 1994).

Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular bacteriana podem induzir a secreção do TGF- β pelos monócitos, contribuindo para a secreção desse peptídeo no local da inflamação. Outras células presentes nesse local, tais como as plaquetas, linfócitos e neutrófilos, igualmente, podem produzir essa citocina. Esse fator de crescimento para poder se ligar aos receptores específicos (glicoproteínas de 53 kD, glicoproteína de 85-110 kD e um dímero composto de sub-unidades de proteoglicanas de 250 - 350 kD), localizados na superfície das células hematopoiéticas, requer ativação proteolítica, a fim de o separar da proteína de ligação de 135 kD (WAHL et al.²⁴⁸, 1993).

O fator beta transformador do crescimento (TGF- β), assim ativado, é secretado na área de inflamação crônica pelos macrófagos. Age, nesse local, estimulando a proliferação das células mesenquimais e a produção do colágeno, glicoaminoglicanas e de fibronectina. Simultaneamente, também, inibe as proteases, impedindo a degradação do colágeno e estimulando a fibrogênese (ROTHER & FALANGA¹⁹³, 1992). Esse fator, igualmente, induz à expressão dos genes c-jun, jun-b e c-fos ativando os fatores de transcrição AP-1 nas células AKR-2B e A549 mediadores da indução do fator de crescimento endotelial vascular (EVGF) pelo fator transformador do crescimento (TGF- β) (PERTOVAARA¹⁷⁷, 1994).

KHALIL et al.¹¹⁷ (1993) estudando o mecanismo de controle do fator beta transformador do crescimento (TGF- β) pelos macrófagos, verificaram que a dexametasona inibia completamente a secreção da IL-1, porém, não apresentava qualquer efeito em relação à secreção desse fator. Atualmente, emprega-se anticorpos para TGF- β na tentativa de inibir a inflamação crônica destrutiva por ele causada (WAHL et al.²⁴⁸, 1993).

Recentemente, foi relatado o sinergismo entre a substância P secretada pelos nervos perivasculares e a IL-1, em relação à indução das células endoteliais à angiogênese. O mecanismo envolvido, ainda, não está completamente esclarecido, entretanto, é possível que a substância P estimule as células endoteliais e neutrófilos à produção do fator ativador das plaquetas, estimulando a migração e a proliferação dessas células (SMITHER & FAN²¹³, 1990).

ZICHE et al.²⁴⁶ (1990) e DETMAR et al.⁴⁷ (1992) sugeriram que um outro provável mecanismo seria o estímulo proporcionado por esses mediadores à produção da collagenase pelos fibroblastos, promovendo a dissolução da membrana basal dos vasos sanguíneos pré-existentes, que antecede o início da angiogênese. Na tentativa de verificar se esse mecanismo envolveria a participação das prostaglandinas, concomitantemente, com a administração da substância P, administrou-se indometacina (7nmol/dia) não se constatando diferença estatisticamente significativa em relação à formação dos vasos (FAN et al.⁶¹, 1993). Esses autores, também, constataram que a ação angiogênica da substância P e IL-1 era resistente ao efeito da mepiramina, cimetidina e WEB-2086. Tais resultados indicaram que a histamina, as prostaglandinas e o PAF não estão envolvidos no estímulo à neoformação vascular.

Confirmando a não participação das prostaglandinas no mecanismo envolvido na angiogênese, SLATER & HOUSE²¹² (1993) ao estudarem o efeito da indometacina em relação ao diâmetro vascular, a velocidade do fluxo sanguíneo e na pavimentação leucocitária, constataram que esse medicamento não alterava a hemodinâmica microvascular. Em conformidade com esse estudo WREN; HILEY; FAN²⁶¹ (1993) relataram que as PGs não influenciavam a produção da endotelina-3 pelas células endoteliais.

É oportuno lembrar que estudos *in vivo* demonstraram que componentes da matriz extracelular como: os diferentes tipos de colágeno, glicosaminoglicanas proteoglicanas e glicoproteínas, entre às quais a fibronectina, tomam parte no processo de ligação, migração e diferenciação das células endoteliais (ORLY & SATO¹⁸⁴, 1979; YAMADA; YAMADA; PASTAN²⁶², 1978; BOOYSE; SEDLAK; RAFELSON²³, 1975). Sendo assim, os inibidores da ciclooxigenase como a Indometacina, que em concentração elevada reconhecidamente bloqueiam a produção de fibronectina (SMITH²¹⁴, 1991), possivelmente, também, reduzam a angiogênese.

Vários outros fatores angiogênicos, dentre os quais: o fator de crescimento endotelial vascular (EVGF), fator transformador do crescimento (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) estimulam a migração, a proliferação, a atividade proteolítica e o comportamento organizacional das células endoteliais (NICOSIA; NICOSIA; SMITH¹⁵⁹, 1994). Atualmente tem sido atribuída no crescimento e diferenciação das células endoteliais, necessárias à organização vascular, centuada importância ao peptídeo PTHrP, produzido em decorrência da ativação gênica no braço curto do cromossoma 12 (RIAN¹⁸⁷, 1994).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) é um peptídeo idêntico a somatomedina C produzido principalmente pelos fibroblastos, que estimula o transporte da glicose e aminoácidos para o meio intracelular inibindo a degradação proteica no interior dos fibroblastos (ROTHER & FALANGA¹⁹³, 1992). Além desses efeitos, pode iniciar a síntese do DNA estimulando a proliferação e diferenciação celular. Em cultura de células ósseas o IGF estimula a produção de proteínas colagênicas e não colagênicas (RAISZ¹⁸², 1983). Embora seja um fator angiogênico menos potente que o PDGF e VEGF ele significativamente aumenta o número de microvasos recém-formados (NICOSIA; NICOSIA; SMITH¹⁵⁹, 1994).

Atualmente, ressalta-se, a importância da interação direta entre os fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e da IL-2 com o sistema imune. JOHNSON & TORRES¹¹⁰ (1985) demonstraram que esses peptídeos eram capazes de estimular a produção do IFN- γ por meio de um mecanismo que não envolveria a proliferação celular ou a síntese do DNA, mas, sim, mediante um mecanismo dependente da elevação do GMPc, que agindo como segundo mensageiro poderia substituir a IL-2 necessária à produção do IFN- γ . Esse peptídeo é capaz de induzir a expressão dos antígenos do complexo maior de histocompatibilidade principal (HLA-classe II), antígenos tumorais e receptores para IL-2 e ICAM-1, bem como ativar os neutrófilos e reduzir a proliferação fibroblástica (BERESINI; LEMPET; EPSTEIN¹⁴, 1988). Essa citocina, ainda, é capaz de estimular a produção do TNF, suprimindo a produção da IL-1 (KAWADA et al.¹¹⁵, 1971).

Como os corticosteróides são capazes de ligarem-se ao DNA, eles podem evitar a ligação dos fatores de crescimento (IL-1, FGF) com os genes responsáveis pela transcrição dessas citocinas, bloqueando-a. Esses fármacos, igualmente, por inibirem a

5-lipoxygenase reduzem a proliferação das células T e a produção de $\text{INF-}\gamma$. Por outro lado, fármacos como a indometacina e o ibuprofem que bloqueiam a ciclooxigenase sem diminuir a produção de LTB_4 podem aumentar a produção desses fatores de crescimento. Recentemente, TATAKIS²³⁰ (1993) relatou que naproxeno e o tenoxicam podem inibir a produção da IL-1 por monócitos/macrófagos.

Os esteróides, também, causam por ativação da ribonuclease a destruição dos RNAm para IL-1 β e TNF- β nos macrófagos, diminuindo conseqüentemente a produção de PGE_2 . Igualmente, inibem a fosfolipase A_2 , estabilizando a membrana lisossomal, inibindo a degranulação celular e diminuindo a disponibilidade do ácido araquidônico e a atividade da ciclooxigenase (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993). Confirmando esses estudos, KUNKEL & CHENSUE¹²⁶ (1985) verificaram que concomitantemente com a redução da síntese de PGs proporcionada pela indometacina havia o aumento do Interferon- γ e da IL-2 por linfócitos T.

Como mencionamos anteriormente, a formação do granuloma depende em grande parte da proliferação e da diferenciação celular. Em relação a esses processos, destacam-se: os fatores estimuladores de colônia (CFS) e os fatores de diferenciação (DFs). Como a maior parte da população celular do granuloma (eritrócitos, plaquetas, linfócitos B, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) são derivados das células pluripotentes originadas da medula óssea. Esses fatores são essenciais para a formação das colônias celulares e indispensáveis à proliferação e à diferenciação das células progenitoras da população celular do granuloma. Na ausência desses fatores a morte celular sobrevém entre 8 e 48 horas (METCALF & MERCHAV¹⁴⁴, 1982).

Dos vários fatores estimuladores de colônia que têm sido atualmente clonados e purificados, os que apresentam importância na formação do granuloma são: IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, TGF- α , o fator estimulador de colônia macrófágico-granulocítico (GM-CSF), o fator estimulador de colônia macrófágico (M-CSF), o fator estimulador de colônia granulocítico (G-CSF), a eritropoietina e o inibidor celular das células progenitoras (proteína inflamatória macrófágica 1/MIP- α) (HEATH et al.⁹³, 1990).

Esses fatores podem agir estimulando a proliferação das células multipotentes, como é o efeito da IL-1, IL-3 e IL-6, ou então, agem como a IL-3, IL-5, IL-4 e eritropoietina, que induzem a produção dos outros fatores estimuladores de colônia (GM-CFC, Eos-CFC, BFU-E, Bas-CFC, Meg-CFC, CFU-e). Já, o GM-CSF, o M-CSF e o G-CSF estimulam a proliferação das colônias específica de células (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos); a produção de outros fatores (GM-CFC, Meg-CFC, Eos-CFC, BFU-E); das citocinas pró-inflamatórias (PGE_2 , IL-1, TNF- α); dos fatores quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos; bem como estimulam a proliferação das células endoteliais (G-CFS) e a produção de produtos derivados do oxigênio (G-CSF, M-CSF). Entre os vários outros efeitos apresentados por esses fatores, merecem destaque: a produção do ativador do plasminogênio e dos interferons pelo M-CSF; a estimulação da proliferação dos linfócitos por IL-3, IL-4, IL-6 e IL-

5, a proliferação das células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais pelo TGF- α ; e o aumento da proliferação e citotoxicidade dos eosinófilos (WOZNEY et al. ²⁶⁰, 1990).

No controle do desenvolvimento da população celular do granuloma, também, participam os chamados fatores de diferenciação. *In vitro* a diferenciação e a pluripotencialidade das células progenitoras mielóides é controlada por um único fator regulador denominado DIALIF ou seja, fator inibidor da leucemia/atividade inibidora da diferenciação, que são expressos em duas formas funcionais distintas, uma das quais é livremente difusível e a outra está presente na matriz extracelular, estando sujeito ao controle molecular específico (HEATH et al. ⁹³, 1990). A expressão do DIALIF tem o desenvolvimento programado e controlado por outros fatores de crescimento, dos quais os mais importantes são os membros da família dos FGFs produzido pelas próprias células progenitoras.

Esses fatores são polipeptídeos de peso molecular variando entre 20 a 70 KDa que apresentam efeitos biológicos, tais como: o estímulo a diferenciação dos neutrófilos, células B e M1 da linhagem celular da leucemia mielóide; fatores de crescimento (IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF); e o estímulo da reabsorção óssea e da síntese de DNA. Além desses efeitos diminuem a atividade da fosfatase alcalina e o nível do RNA_m para o tipo I de colágeno, enquanto aumenta o nível do RNA_m necessário à síntese de osteopontina, diminuindo a atividade da fosfatase alcalina e potencializando o efeito que o ácido retinóico apresenta na atividade da fosfatase alcalina. O efeito desses fatores se deve a ligação aos receptores de membrana estruturalmente semelhantes aos da IL-6 (LORENZO ¹³⁵, 1991).

2.2. ATIVIDADE SECRETORA DOS MACRÓFAGOS E O PROCESSO DA REABSORÇÃO ÓSSEA

Os produtos da síntese e secreção dos macrófagos desempenham papel importante no controle da perda óssea associada ao processo inflamatório presente na artrite reumatóide, doença periodontal e osteomielite.

Além dessas doenças, muitas outras doenças granulomatosas de origem odontogênica, ou não, acometem o tecido ósseo causando a sua destruição. Dessas, ressaltamos, nas lesões periapicais de origem odontogênica, a importância dos produtos de síntese e secreção dos macrófagos, no controle do processo da reabsorção óssea a elas associado.

A seguir, objetivando o aprofundamento dos conhecimentos relativos a esse processo, procederemos à revisão da literatura, direcionando-a no sentido de analisar criticamente a participação dos produtos de síntese e secreção dessas células, no controle local do processo reabsortivo ósseo.

No tecido ósseo, o mecanismo inicial da ativação dos osteoclastos permanece especulativo. É possível que a morte dos osteócitos reduza a concentração do cálcio circulante estimulando as paratireóides a produção do PTH. Concomitantemente, inicia-se o influxo das células originárias do sangue, e a multiplicação das células mesenquimais indiferenciadas perivascularas (células osteoblásticas), que migraram para o local da reabsorção atraídas quimiotaticamente (TEN CATE²³², 1988).

Lá chegando, essas células, em resposta ao PTH, produzem enzimas destrutivas teciduais, principalmente, pró-colagenases, que ao serem ativadas pela plasmina, tomam-se capazes de remover a camada do material orgânico não mineralizado e não reabsorvível, expondo o mineral à atividade reabsortiva osteoclástica (LORENZO¹³⁵, 1991). Não obstante, *In vitro*, McSHEEDHY & CHAMBERS¹⁴⁸ (1986) encontraram evidências de que o mecanismo de estimulação da atividade osteoclástica pelo PTH, poderia ocorrer na superfície óssea independente da exposição mineral pelos osteoblastos, visto que ele já está exposto na superfície óssea fragmentada pelo corte.

Em nível molecular a estimulação inicial do processo reabsortivo ósseo, possivelmente, envolve a conversão do estímulo hormonal em atividade bioquímica, mediante a ligação do agente estimulador (PTH, PGs, LTs, trombina, bradicinina, IL-1 e TNF) aos receptores da membrana (proteína G via fosfolipase C ou adenilciclase), com a posterior indução dos sistemas enzimáticos capazes de gerar mediadores secundários (monofosfato de adenosina cíclica (AMPe), o inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DG), ativadores dos osteoblastos à produção do fator solúvel capaz de estimular a atividade osteoclástica (MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

O AMPe resulta da ativação da adenilciclase produzida pela ligação dos fatores estimuladores da reabsorção óssea aos receptores da membrana das células osteoblásticas, via ativação da proteína G. Já o diacilglicerol (DG) e o inositol trifosfato (IP₃) podem ser produzidos nessas células, como efeito da ativação da proteína G, via estímulo da fosfolipase C presente nas membranas das células osteoblásticas produzindo a hidrólise dos glicolípídeos contendo inositol. O diacilglicerol e o trifosfato de inositol formados em decorrência dessa hidrólise, agem, respectivamente, ativando a proteína quinase C (PKC) e removendo o cálcio do retículo endoplasmático das células osteoblásticas, mediante mecanismo dependente do ATP (SCULLY²⁰⁷, 1992).

As células osteoblásticas, assim ativadas, produziram um fator estimulador da atividade reabsortiva dos osteoclastos (ORSA), que diretamente estimularia a reabsorção óssea pelos osteoclastos, pois a afinidade apresentada por esse fator as glicoaminoglicanas da matriz não colagênica, facilitaria a localização do campo de ação dos osteoclastos (FULLER; GALLAGHER; CHAMBERS⁷⁸, 1991).

A vitamina D₃ é um outro fator que participa ativamente tanto da formação quanto da reabsorção óssea. Essa vitamina pode ter origem exógena proveniente da dieta ou endógena por irradiação do deidrocolesterol da pele. Desse modo gerada, a vitamina

D₃, induz tanto à diferenciação das células progenitoras mielóides dos osteoclastos, quanto à síntese e secreção de PGE₂ e LTs pelos monócitos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e osteoblastos, elevando a concentração local desses eicosanóides (MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

No processo de formação óssea, ela estimula a síntese da matriz óssea pelos osteoblastos, uma vez que induz a produção da osteocalcina e osteopontina, aumentando, respectivamente, a afinidade pelo cálcio e o número dos receptores da membrana celular capazes de fixar os osteoblastos na matriz. No processo de reabsorção óssea, estimula a diferenciação dos pró-monócitos em monócitos e esses em osteoclastos.

A importância da vitamina D₃ no processo de proliferação e diferenciação das células progenitoras dos osteoclastos pode ser comprovada em estudos *in vitro*, nos quais, a adição de 1, 25 (OH)₂D₃ determinou o aumento do número de células gigantes multinucleadas e de núcleos positivamente corados com anticorpos monoclonais para osteoclastos (FULLER & CHAMBERS⁷⁵, 1987).

A participação dos fatores estimuladores das colônias celulares (CEFs) e dos fatores de diferenciação (DIFs) assume, igualmente, fundamental importância no processo de reabsorção óssea, visto que são necessários à formação dos osteoclastos a partir das células progenitoras mielóides regulando a proliferação e a diferenciação dessas células. Eles influenciam o número das células necessárias à formação dos osteoclastos. Contudo, não participam diretamente da sua formação. Também, podem, indiretamente, por meio do estímulo à geração de citocinas reabsorptivas (PGE₂, IL-1, TNF- α ...), induzir à atividade reabsorptiva dos osteoclastos (LORENZO¹³⁵, 1987). Um dos mecanismos geradores desses fatores são os osteoblastos estimulados pelo PTH e/ou citocinas reabsorptivas ósseas (ELEANOR-WEIR et al.⁵⁶, 1989).

Embora a vitamina D₃ e os fatores estimuladores das colônias celulares (IL-3 ou GM-CSF) ajam sinergicamente em relação à formação dos osteoclastos; o efeito da 1, 25 (OH)₂D₃ estimulador da formação dessas células, mesmo na ausência dos fatores estimuladores de colônia, sugere que diferentes mecanismos estão envolvidos na formação daquelas células. É possível que a IL-3 ou GM-CSF causem a proliferação das células blásticas mielóides, enquanto que a vitamina D₃ estimularia a sua diferenciação em osteoclastos (KURIHARA et al.¹²⁷, 1989).

Um aspecto do mecanismo funcional dos osteoclastos, que permanece controverso, devendo ser revisto e esclarecido, é o papel dos eicosanóides, particularmente, das PGs e LTs desempenhariam no mecanismo da ativação dos osteoclastos pelos osteoblastos. Possivelmente, o aumento da concentração da PGE₂ induzida por IL-1, mediante o aumento da concentração intracelular de cálcio, do metabolismo do inositol trifosfato e do AMPc ativa os osteoblastos, induzindo essas células a liberação de um fator solúvel, estruturalmente semelhante à IL-1, capaz de iniciar o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos (MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

Esse estudo contrariou o trabalho de THOMPSON; SAKALATVALA; CHAMBERS²³⁵ (1988), segundo o qual, a IL-1 mediante um efeito primário sobre os osteoblastos, induziu-os à transmissão de um sinal de curto alcance indutor da reabsorção óssea osteoclástica, independente da produção de PGs ou do fator solúvel difusível anteriormente citado. MEGHJI¹⁵⁰ (1992) também demonstrou que os leucotrienos (LTs), por meio de um mecanismo que parece ser modulado pela síntese endógena de PGs estimulavam a reabsorção óssea. O mecanismo envolvido pode ser a ativação da proteína G via fosfolipase C causando aumento do inositol tri-fosfato (IP₃) e de cálcio citosólico.

Recentemente, AKAMINE et al.³ (1994) com base na proximidade dos macrófagos e osteoblastos, em áreas de reabsorção óssea ativa, durante a fase avançada da doença periodontal, sugeriram que as citocinas e os fatores de crescimento produzidos por essas células poderiam interagir com os osteoblastos ativando-os à liberação do fator solúvel necessário ao processo reabsorção óssea.

Outrossim, o fato da presença dos osteoclastos não ser comumente observada no processo alveolar de pacientes com doença periodontal, assim como a ausência do infiltrado inflamatório nas proximidades do osso alveolar em reabsorção (CAWSON; BINIE; EVESON²⁹, 1995), sugere que macrófagos e fibroblastos presentes no ligamentamento periodontal, estimulados por citocinas provenientes do infiltrado inflamatório subjacente à bolsa periodontal, também, possam reabsorver o tecido ósseo.

Em conformidade com esse mecanismo citamos o trabalho de HARVEY⁸⁸ (1988) que demonstrou a presença dos macrófagos e fibroblastos na proximidade do osso em reabsorção. Achados semelhantes foram relatados por PONGSRI & RYGH¹⁷⁸ (1994), que ao estudarem o processo de reabsorção radicular em dentes submetidos às forças ortodônticas anormais, verificaram a acentuada participação dos macrófagos, principalmente, na fase inicial do processo de reabsorção dentária.

As principais células promotoras do processo da reabsorção óssea, os osteoclastos caracterizam-se por acentuada atividade enzimática (catepsina B e G, fosfatase ácida e ATPase H⁺ tipo vacuolar), verificada, principalmente, nos numerosos lisossomos e vacúolos redondos localizados no citoplasma próximo a borda franzida; no sistema de Golgi com as suas cisternas e vesículas localizadas no citoplasma perinuclear; nas numerosas mitocôndrias e cisternas do sistema reticular endoplasmático (RER); e nos canais presentes na borda franzida (SASAKI²⁰¹, 1992). O processo bioquímico que produz a dissolução da matriz mineralizada causa o acúmulo extracelular de ácido nas proximidades da borda franzida.

Outra questão polêmica é a origem dos osteoclastos. Os estudos mais antigos, baseados na propriedades dessas células em degradar (fragmentar) o tecido conjuntivo, liberando mineral das partículas ósseas desvitalizadas, bem como pela capacidade dos macrófagos de fusionarem-se, formando células multinucleadas, que apresentam

características estruturais semelhantes aos osteoclastos, sugeriram ser o macrófago a célula de origem dos osteoclastos.

Todavia, estudos de cultura recentes demonstraram, mediante a adição dos fatores de crescimento IL-3 ou GM-CSF, a impossibilidade da diferenciação dos macrófagos em osteoclastos (LORENZO¹³⁵, 1991; KURIHARA et al.¹²⁷, 1989). Além do mais, os seus antígenos de superfície, também, diferem dos antígenos dos osteoclastos, impossibilitando-os de reagirem com anticorpos monoclonais (Mabs) capazes de identificar monócitos e osteoclastos multinucleares (FULLER & CHAMBERS⁷⁵, 1987).

Com a origem macrofágica tendo sido descartada, levantou-se a hipótese de que as células hematopoiéticas totipotentes seriam as precursoras dos osteoclastos (ASH; LOUIT; TOWNSEND⁹, 1980; LORENZO et al.¹³⁴, 1987; FULLER & CHAMBERS⁷⁵, 1987). Em consonância com essa origem mencionamos o estudo de KURIHARA et al.¹²⁷ (1989), no qual as células blásticas mielóides apresentariam algumas das características dos osteoclastos, como a positividade para marcadores dessas células (TRAP), que aumenta na presença de vitamina D₃ e diminui na presença de calcitonina. Contudo, também, foi demonstrado que os macrófagos sob certas condições patológicas tomavam-se TRAP-positivos, podendo semelhantemente aos osteoclastos apresentar atividade reabsortiva óssea (BRUDVIK & RYGH,²⁵ 1994).

A ação da vitamina D₃, em relação ao processo de reabsorção óssea, já foi revista anteriormente. Portanto, a nós resta rever a participação da calcitonina no referido processo. MALGAROLI et al.¹³⁸ (1989) propôs o efeito direto da calcitonina sobre os osteoclastos inibindo a sua atividade osteoclástica. Tal efeito seria decorrente do aumento citosólico do cálcio, produzindo a diminuição dos podossomas, ou seja, das protusões da zona clara da membrana ventral dos osteoclastos responsáveis pela sua aderência a matriz calcificada para fragmentá-la.

Contudo, vários outros estudos, dentre eles os de RAISZ¹⁸² (1988), de LORENZO¹³⁵ (1991) e de MEGHJI¹⁵⁰ (1992) demonstraram que esse hormônio reduz a formação dos osteoclastos, possivelmente, por meio de um mecanismo que envolveria a sua ligação aos numerosos receptores localizados na superfície de membrana das células mielóides progenitoras dos osteoclastos, promovendo o aumento do nível intracelular do AMPc e a inibição da proliferação celular.

Outra consequência da elevação da concentração desse nucleotídeo é a promoção da contração da membrana celular, com a diminuição da área da superfície da borda franjada e o bloqueio da anidrase carbônica, reduzindo a concentração do ácido carbônico na referida borda, bem como a sua atividade reabsortiva (MEGHJI¹⁵⁰, 1992; LORENZO¹³⁵, 1991). Todavia, esses efeitos são somente transitórios, visto que essas células mediante mecanismos pouco esclarecidos podem escapar do efeito da calcitonina.

Na tentativa de esclarecer o mecanismo do escape dos osteoclastos, LORENZO¹³⁵ (1991) sugeriu a possibilidade da regulação para baixo dos receptores para a calcitonina. Uma hipótese alternativa foi proposta por MEGHJI¹⁵⁰ (1992), segundo a qual, gerar-se-ia uma população de osteoclastos insensíveis à ação desse hormônio.

Didaticamente a reabsorção óssea pode ser dividida em três fases: 1) desmineralização, 2)- fragmentação da matriz orgânica e 3)- transporte dos produtos solúveis para a circulação sanguínea (BHASKAR¹⁷, 1989).

Durante a desmineralização do tecido ósseo, a solubilização dos componentes inorgânicos desse tecido ocorre em um microambiente ácido (pH= 4,5 - 5), induzido por um mecanismo bombeador de prótons (H^+ ATPase), presente na borda franzida dos osteoclastos, que estabelece um gradiente de PH. A regulação do PH Intracelular é promovida pela anidrase carbônica presente no citoplasma, secretora do bicarbonato via troca HCO_3^-/CO_2 . Imediatamente após a solubilização do mineral ósseo, as enzimas hidrolíticas ácidas e catepsina secretadas pelos osteoclastos, passam a degradar (fragmentar) as proteínas colagênicas e não colagênicas da matriz óssea (SASAKI²⁰¹, 1992), resultando na liberação de vários produtos biologicamente ativos presentes nessa matriz.

Vários fatores locais e sistêmicos participam do controle do processo de reabsorção óssea. Dentre os fatores sistêmicos, RAISZ & KREAN¹⁸³ (1983) citam o hormônio do crescimento, o tireoideano, os glicocorticóides, o paratormônio, a calcitonina e a vitamina D_3 . Entre os locais, destacam-se vários produtos resultantes da ativação das células presentes no local da reabsorção, tais como: PGE_2 , IL-1, TNF, TGF, FGF, IGF, EGF, PDGF, do fator estimulador de colônia (IL-3) e dos fatores indutores da diferenciação (DIFs).

Dos vários modelos de estudo que se prestam à análise da participação dos produtos biologicamente ativos liberados pelos macrófagos, no controle do processo da reabsorção óssea, daremos ênfase à doença periodontal, que sob a nossa óptica apresenta maior interesse para a odontologia.

Na doença periodontal inflamatória, os componentes microbianos da placa bacteriana dental, especialmente, os lipopolissacarídeos constituintes da parede celular das bactérias anaeróbias gram negativas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) e várias espécies de *Bacteróides*, *Porphyromonas*, *Wolinella recta* e *Fusobacterium nucleatum* ativam os macrófagos e linfócitos à produção de vários produtos biologicamente ativos, capazes de controlar a reabsorção óssea local (PAGE¹⁷⁰, 1991; MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

As endotoxinas liberadas pelos A.a. indutoras de fenômenos patológicos, tais como: a reação de Schwartzman, o aumento da toxicidade dos macrófagos, a agregação plaquetária, a ativação do complemento e a produção de IL-1 e TNF,

promovem o aumento da quimiotaxia celular e da reabsorção óssea. Por outro lado, a IL-1 produzida pelas células presentes no tecido inflamado pode funcionar como fator de crescimento das bactérias virulentas.

Acrescido a esses produtos, devemos ressaltar que os polissacarídeos constituintes da parede celular de bactérias como a *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* podem estimular os fibroblastos a expressão do gene responsável pela produção da IL-8, uma potente citocina quimiotática para neutrófilos, que, também, é produzida por macrófagos e células endoteliais presentes no local da inflamação. A secreção da IL-8, igualmente, pode ser estimulada pela ação sinérgica da IL-1 e do TNF, por meio de um mecanismo independente da produção da PGE₂, enquanto que o INF- γ inibe a produção da IL-8 (TAKIGAWA et al. ²²⁷, 1994).

MANHART et al. ¹⁴⁰ (1994), do mesmo modo, demonstram que o *Porphyromonas gingivalis* é capaz de estimular as células mononucleares do tecido gengival a produção da IL-4 e da IL-2, que, respectivamente, têm sido associadas com as fases iniciais da gengivite e da periodontite rapidamente progressiva. Os lipopolisacarídeos presentes na parede celular desses microorganismos, ao se ligarem inicialmente em proteínas presentes no soro e posteriormente aos receptores CD14 dos neutrófilos, também, estimulam a produção do radical superóxido, o qual, sinergicamente, pode interagir com enzimas e proteínas catiônicas exacerbando a destruição tecidual (SHAPHIRA et al. ²¹⁰, 1994).

Esses microorganismos, igualmente, produzem leucotoxinas que inibem a proliferação das células CD4/CD8, ativando as células T auxiliares para a produção da IL-3 e/ou moléculas semelhantes capazes de estimular as células B à produção de imunoglobulinas (IgG), bem como à produção de anticorpos. A produção excessiva da IgG pode exacerbar a destruição tecidual pelo estímulo à formação de imunocomplexos, ativação do complemento, degranulação dos neutrófilos e aumento da produção pelos macrófagos do radical superóxido e dos metabólitos derivados do ácido araquidônico. Há uma relação direta entre a produção IgG e a dose de PGE₂. Altas doses de PGE₂ causam discreto aumento na produção de IgG, enquanto que baixas doses produzem significativo aumento na produção de IgG.

Possivelmente, a explicação para esse efeito, decorre do fato das células B presentes no tecido inflamado apresentarem os receptores para esse eicosanóide em maior número. Um outro mecanismo possível pode ser decorrente da presença de clones celulares que apresentam os receptores com maior ou menor afinidade para PGE₂. Também é possível que nas células B apresentem receptores com alta e baixa afinidade pela PGE₂. Parece haver um efeito sinérgico entre a IL-4 e baixas doses de PGE₂, resultando em um aumento da produção da IgG (HARREL & STEIN ⁸⁵, 1995). Outrossim, aqueles microorganismos produzem toxinas inibidoras da atividade dos leucócitos frente aos antígenos e mitógenos, diminuindo a resposta do organismo frente à agressão (HARVEY ⁸⁸, 1988).

No tecido ósseo, *in vivo*, a IL-1 não age diretamente nos osteoclastos, visto que essas células não apresentam receptores para a citocina, mas, sim, estimula a atividade da ciclooxigenase e a produção de PGE_2 , principalmente, pelos osteoblastos (3.000 - 15.000 receptores/cel.), macrófagos, linfócitos e plasmócitos presentes na área da inflamação, visto que essas células apresentam para a IL-1 com peso molecular de 70 a 80 KD (LORENZO¹³⁵, 1991). Em nível ósseo local, a concentração elevada desse prostanoide estimula os osteoblastos a produção de um fator solúvel capaz de ativar os osteoclastos a reabsorção óssea. A natureza do sinal osteoblástico induzido pela IL-1, ainda, permanece obscura.

Em consonância com esse mecanismo, o trabalho de KUNKEL, CHENSUE; PHAN¹²⁵ (1986) demonstrou ser a PGE_2 o mediador endógeno da produção de IL-1, sugerindo que a produção dessa citocina e do fator do crescimento fibroblástico (FGF) sejam auto-reguladas por esse prostanoide, ou seja, a IL-1 diretamente produziria o seu próprio inibidor, a PGE_2 . Possivelmente, o elo de ligação entre o mecanismo da produção de PGs e de IL-1 seja o aumento da concentração do AMPc, necessária à produção da IL-1 pelos osteoblastos.

Em parte, a importância da participação desse nucleotídeo no controle do processo de reabsorção óssea já havia sido elucidada pelo trabalho de KANTOR & HAMPTON¹¹¹ (1978) que demonstraram ser a indometacina capaz de inibir às proteínas quinases ativadas pelo AMPc, bloqueando o subsequente aumento intracelular do AMPc, decorrente da ativação pelas PGs da enzima adenilciclase presente nos osteoblastos, osteoclastos e macrófagos. Esses resultados indicaram que esse nucleotídeo, e, possivelmente, o cálcio modulam o efeito da IL-1. Eles, também, sugeriram que o efeito reabsorvivo da IL-1, pelo menos, em parte, é dependente da síntese de PGs.

É possível que a transdução (conversão) transmembrana do estímulo responsável pela atividade reabsorviva da IL-1 esteja diretamente relacionada com os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc. Tais nucleotídeos funcionariam como mensageiros na conversão do estímulo reabsorvivo em atividade bioquímica, agindo como moléculas reguladoras da diferenciação. O mecanismo envolvido pode ser o influxo de cálcio e/ou sódio, via mecanismo bioelétrico (fenômenos elétricos que ocorre nos tecidos vivos), diminuindo a concentração de AMPc aumentando a secreção dos fatores de crescimento e disparando o "gatilho" da proliferação celular.

O subsequente aumento da concentração de AMPc estaria associado à diferenciação dos osteoblastos e demais células relacionadas ao processo de reabsorção (HARVEY⁸⁸, 1988), visto que a bioeletricidade aumenta a produção dos fatores de crescimento. Portanto, todos os fatores que aumentam o nível de AMPc estimulam a produção da IL-1 pelas células ósseas (TATAKIS²³⁰, 1993). Por outro lado, o aumento da concentração de GMPc tem sido relacionada a inibição da reabsorção óssea induzida por IL-1, pois inibe a adenilciclase e, conseqüentemente, o aumento do AMPc (TATAKIS²³⁰, 1993); nucleotídeo diretamente responsável pela expressão genica da IL1 e

do TNF, bem como pelo aumento da resposta reabsortiva óssea e da secreção da colagenase induzida pela IL-1 (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS ¹⁶³, 1993).

Visto que alguns dos inibidores da ciclooxigenase bloqueiam a síntese de PGs sem interferir, podendo, até mesmo, aumentar a produção da IL-1, sem influenciar a atividade da lipooxigenase (KUNKEL; CHENSUE; PHAN¹²⁵, 1988), vários trabalhos foram publicados afirmando que esses fármacos não reduziram o processo de reabsorção óssea. Confirmando esse efeito, HEATH et al.⁹² (1985) sugeriram que em cultura de células ósseas, o processo de reabsorção era independente da síntese de PGs, visto que a adição de 0,5 e 5,0 µg/ml de indometacina não reduziu aquele processo. Contudo, trabalhos mais recentes, têm atribuído ao tenidap e ao naproxeno efeito inibidor da síntese da IL-1 e da reabsorção óssea (OTTERNESS et al. ¹⁶⁶, 1991; SIPE et al. ²¹¹, 1992).

Tem sido demonstrado que os produtos metabólicos da lipooxigenase como o leucotrieno B₄ e o 5-HETE, também, participam ativamente do processo da reabsorção óssea, uma vez que induzem à produção da IL-1 o estimulando *in vitro*. É possível que um desses metabólitos seja o fator solúvel difusível produzido pelos osteoblastos capaz de estimular a reabsorção osteoclástica, uma vez que os inibidores da 5-lipoxigenase bloqueiam a produção daquele fator (MEGHJI ¹⁵⁰, 1992).

O mecanismo envolvido no processo da síntese da IL-1 pode ser dividido em três fases. Inicialmente ocorre a interação dos produtos da lipooxigenase (LTB₄), produzido por neutrófilos e monócitos/macrófagos presentes no local da reabsorção, com os receptores de membrana dos monócitos, macrófagos e osteoblastos causando a desrepressão gênica da IL-1. Imediatamente após, ocorre a transcrição em RNA_m e a sua posterior tradução (ROLA-PLESZCZYNSKI & LEMAIRE ¹⁹¹, 1985). Portanto, fármacos corticosteróides como a dexametasona que inibem tanto a ciclooxigenase quanto a lipooxigenase, bloqueiam a produção da IL-1 diminuindo a reabsorção óssea (McSHEEDHY & CHAMBER¹⁴⁸, 1986). Para PAGE¹⁷⁰ (1991) esses fármacos inibem tanto a tradução quanto a transcrição gênica necessária à síntese da Interleucina 1 (IL-1).

A interação da IL-1 com outros fatores estimuladores do processo reabsortivo já é por demais conhecido. Como sabemos, o hormônio paratireoidiano (PTH), o peptídeo semelhante ao hormônio paratireoidiano (PTHrP) e o fator transformador do crescimento (TGF) apresentam efeito sinérgico com a IL-1, em relação à síntese de PGE₂. Com esse último fator (TGF), a IL-1 apresenta efeito sinérgico inibindo a síntese do colágeno, enquanto que com o fator necrótico tumoral (TNF), igualmente, age sinergicamente estimulando a reabsorção óssea, a formação dos osteoclastos, e a produção e a secreção da fosfolipase A₂ e da IL-6 (PAGE¹⁷⁰, 1991; MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

A interleucina 1 (IL-1), também, aumenta a diferenciação das células progenitoras dos osteoclastos. A propósito disso, outro efeito dessa citocina que apresenta acentuada importância na formação dos osteoclastos necessários ao processo de reabsorção óssea é a possibilidade da sua ação sinérgica com os fatores estimuladores

de colônia (GM-CSF e IL-3), induzindo a proliferação e a diferenciação das células mielóides (macrofágicas/granulocíticas) progenitoras presentes na medula óssea (HEYWORTH et al.⁹⁶, 1990).

Na doença periodontal inflamatória, a penetração dos antígenos e das endotoxinas de origem bacteriana entre os espaços das células epiteliais, alargados por enzimas hidrolíticas liberadas por microorganismos da placa bacteriana dental, principalmente, na região da vertente dentária da gengiva livre e no sulco gengival formam imunocomplexos com os anticorpos circulantes, capazes de ativar o complemento, gerando fatores quimiotáticos e de ativação de neutrófilos e macrófagos, necessários ao processo da fagocitose.

Em decorrência do estado de ativação dessas células, além da produção das enzimas lisossomais, geram-se outros produtos biologicamente ativos, dentre os quais a IL-1 α , que além de influenciar diretamente a reabsorção óssea, igualmente, apresenta fundamental importância na fase da periodontite marginal, pois estimula a expressão dos antígenos nas células de Langerhans presentes no epitélio gengival e das moléculas da aderência intercelular ICAM-1 e ELAM-1 nas células endoteliais, capazes de aumentar a migração dos macrófagos e neutrófilos para o tecido inflamado (MASADA et al.¹⁴² 1990).

Associado ao processo da destruição tecidual promovido por essas células, também, devemos lembrar que as proteinases presentes na placa bacteriana dental, assim como as metaloproteinases inativas do tecido conjuntivo podem ser ativadas promovendo a lise tecidual. Em decorrência disso, são gerados substâncias antigênicas capazes de induzir às respostas imunes humoral e celular. Com a ativação dos linfócitos T e da formação de imunocomplexos decorrentes da ativação dos linfócitos B, além da quimiotaxia e da ativação dos macrófagos com a liberação das enzimas lisossomais e da produção da IL-1 α , são gerados outros produtos indutores do aumento da permeabilidade vascular e facilitadores da transmigração celular, exacerbando a destruição tecidual (MASADA et al.¹⁴² 1990).

Outro mecanismo pelo qual as bactérias anaeróbias presentes na placa microbiana dental podem estimular a produção da IL-1 pelos macrófagos é mediante a produção dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos butírico, propiônico e iso-butírico), identificados em ordem decrescente de potência no fluido gengival das bolsas periodontais (EFTIMIADI et al.⁵⁵, 1991).

A cromatografia de extratos obtidos dessas lesões na fase ativa da reabsorção óssea, demonstrou a presença de macromoléculas de peso molecular compreendido entre 30-60 kDa e 15-20 kDa, respectivamente compatíveis com interleucina-1 (IL-1) e fator necrótico tumoral (TNF). Além disso, foi verificado que o tecido periodontal inflamado produzia maior quantidade de IL-1 α do que IL-1 β e TNF (WANG & STASHENKO²⁴⁹, 1993). Nesse estudo, a relação da presença dessas citocinas com a atividade reabsorptiva das lesões periodontais indicou que as lesões mais ativas apresentavam IL-1 β em maior

quantidade. Esse resultado sugeriu que a IL-1 β é o principal mediador químico do processo de reabsorção óssea presente na doença periodontal.

Tais resultados confirmaram o trabalho de STASHENKO et al.²²¹ (1991), em relação à importância na patogênese da doença periodontal inflamatória das citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF, visto que nos tecidos saudáveis elas se apresentaram em menor quantidade. Por esse trabalho, também, foi demonstrada a correlação significativa entre IL- β e TNF- α , indicando a expressão relacionada dessas citocinas. Recentemente, TSAI et al.²³⁶ (1995) ao compararem o nível de Interleucina-1 β e da Interleucina-8 no fluido gengival de pacientes adultos com periodontite, com o de indivíduos normais, verificaram que os primeiros apresentavam essas citocinas em maior nível.

Também foi demonstrado por RASCH et al.¹⁸⁶ (1995), o efeito estimulador da produção da IL-1 secretada dos monócitos e osteoclastos ativados, proporcionado pelo fator ativador das plaquetas (PAF), produzido pelas plaquetas, neutrófilos, células endoteliais, eosinófilos, monócitos e linfócitos, exacerbando a reabsorção óssea na doença periodontal. Além do mais, o PAF estimula a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, podendo, também, agir sinergicamente com outras citocinas produzidas pelas células presentes no local da inflamação, induzindo a ativação dos polimorfonucleares neutrófilos, a agregação e a fagocitose dos monócitos/macrófagos, a ativação dos eosinófilos, o aumento da permeabilidade vascular, a vasoconstrição e a contração da musculatura lisa. Age nos linfócitos T inibindo a produção da IL-2, bem como regulando a função dos linfócitos B. Tais efeitos sugerem que o PAF participa da reação inflamatória responsável pela destruição tecidual constatada durante a doença periodontal.

As citocinas IL-1 e TNF- α produzidas pelos macrófagos presentes no tecido periodontal inflamado, em decorrência do estímulo por lipopolissacarídeos bacterianos, infocinas e complexos imunes, também, podem induzir à produção tanto autócrina como parócrina das metaloproteinases, bem como ativá-las no tecido conjuntivo inflamado.

A análise do líquido crevicular gengival em áreas de lesões periodontais demonstrou que os neutrófilos são a fonte predominante de collagenase e gelatinase durante o estágio agudo da doença periodontal inflamatória. Como essas enzimas estão diretamente relacionadas à destruição tecidual, sugeriu-se a possibilidade, com base na sua concentração no líquido crevicular, de estabelecer-se a relação delas com a intensidade da destruição tecidual (OVERALL; WRANA; SODEK¹⁶⁷, 1991).

Parocrinamente, a produção de IL-1 pelos macrófagos estimula mais acentuadamente os fibroblastos do tecido gengival, comparativamente, aos fibroblastos do tecido periodontal, a produção de proteinases como a estromelisin, procollagenase, serina proteinase; e do ativador do plasminogênio tipo uroquinase, que converte o plasminogênio em plasmina ativando as metaloproteinases latentes capazes de degradar a matriz extracelular (PAGE¹⁷⁰, 1991). A possível explicação para a menor resposta dos fibroblastos do ligamento periodontal à ação da IL-1 pode ser o menor número de

receptores para a citocina presente nos fibroblastos do ligamento periodontal, comparativamente aos da gengiva (RICHARDS & RUTHERFORD¹³⁸, 1988).

Outro aspecto da atividade dessas enzimas que permanece obscuro é o efeito que a PGE₂ apresenta em relação ao seu funcionamento. *In vitro*, a atividade das metaloproteínases é reduzida mediante a adição de PGE₂. Possivelmente, esse efeito é decorrente da supressão da produção da IL-1 e do TNF- α . Por outro lado, *In vivo*, é possível que esse prostanóide, por meio do aumento intracelular do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), necessário à síntese das metaloproteínases, ative essas enzimas exacerbando a destruição do tecidos periodontais e ósseo (PAGE¹⁷⁰, 1991). Em consonância com essa hipótese, citamos o efeito bloqueador da produção das metaloproteínases por fármacos inibidores da síntese de PGs, como a indometacina e dexametasona.

As metaloproteínases, também, assumem fundamental importância na fase inicial do processo de reabsorção óssea, quando os osteoblastos são estimulados a produzi-las degradando o material orgânico presente na matriz óssea, expondo o tecido mineralizado à reabsorção osteoclástica. A semelhança apresentada pelos fibroblastos, macrófagos e neutrófilos presentes no ligamento periodontal, com relação à produção de procólagenases mediante o estímulo por IL-1 e TNF, via mecanismo dependente da baixa produção de PGE₂, sugere que essas células apresentem um mecanismo semelhante aos osteoblastos em relação à produção dessas enzimas (LORENZO¹³⁵, 1991; OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993).

O mecanismo envolvido na produção das metaloproteínases, deve-se à participação de produtos de proto-oncogenes, possivelmente, resultantes da ativação do c-fos, que regulam a transcrição gênica, evidenciada pelo aumento da síntese protéica e do RNA-mensageiro (SCULLY²⁰⁷, 1992; PAGE¹⁷⁰, 1991). Já, a ativação dessas enzimas pode ser iniciada pela produção por macrófagos e fibroblastos, presentes no tecido inflamado, do ativador do plasminogênio tipo uroquinase, conversor do plasminogênio em plasmina e iniciador da cascata de reações que culminam com a ativação das proenzimas metaloproteínases neutras formadoras de estreptomelinsina e colagenase, respectivamente, enzimas fragmentadoras das proteoglicanas e colágeno (KUNG & LAU¹²⁴, 1993).

Com base no efeito dos fármacos antiinflamatórios esteróides como a dexametasona capaz de inibir a síntese da IL-1, diminuindo ou suprimindo a destruição tecidual induzida por essa citocina, PAGE¹⁷⁰ (1991) sugeriu que o efeito inibidor das metaloproteínases apresentada por aquele fármaco, poderia ser causado pela interrupção da rota de conversão da forma latente para a ativa dessas enzimas, mediante a elevação do nível local do fator inibidor do plasminogênio (TIMP). Além desse mecanismo é possível que a inibição da síntese de IL-1 pela dexametasona possa reduzir a produção das metaloproteínases ativas pelos macrófagos e da metaloproteínases latentes pelos ceratinócitos, bem como inibir a produção do fator ativador do plasminogênio por macrófagos e fibroblastos (PAGE¹⁷⁰, 1991).

Outro mecanismo redutor da atividade dessas enzimas, pode ser decorrente do bloqueio nos macrófagos e linfócitos dos receptores A2 pelo aumento local da adenosina induzida pelo metotrexato, resultando na inibição da síntese do TNF e da PGE₂ por aquelas células (CRONSTEIN³⁸, 1992).

Considerando que a síntese das metaloproteinases pelos macrófagos é estimulada pela produção de PGE₂, via aumento da concentração do AMPc; os antiinflamatórios não esteróides, que, reconhecidamente, bloqueiam a ciclooxigenase diminuindo a concentração desse nucleotídeo, reduzem a produção da poliamina putrescina pela ornitina descarboxilase, bloqueando a produção das metaloproteinases (WAHL & CORCORAN²⁴⁷, 1993).

Como as citocinas IL-1 e TNF, mediante um mecanismo dependente da baixa concentração de PGE₂, igualmente, estimulam a produção das metaloproteinases (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁸³, 1993), é possível que fármacos antiinflamatórios não esteróides como o tenidap e naproxeno, capazes de reduzirem a secreção de IL-1 inibam mais acentuadamente a produção dessas enzimas (TATAKIS²³⁰, 1993), comparativamente, a indometacina que inibe a produção da PGE₂ sem influenciar a síntese daquelas citocinas.

O interferon gama (INF- γ) por inibir a síntese dos eicosanóides, particularmente da PGE₂, inibe a produção das metaloproteinases collagenase/gelatinase e estreptomilesina (WAHL & CORCORAN²⁴⁷, 1993). Portanto, um outro mecanismo, possivelmente, envolvido na inibição da produção das metaloproteinases pelos antiinflamatórios esteróides (dexametasona) e não esteróides (indometacina e tenoxicam), pode ser o aumento do estado de ativação dos macrófagos e da produção de INF- γ , conseqüente ao bloqueio da síntese de PGE₂.

A interleucina-6 (IL-6) é uma outra citocina multifuncional produzida pelos fibroblastos, osteoblastos e células hematopoiéticas, capaz de se ligar ao seu receptor (IL-6R), uma glicoproteína composta por 449 aminoácidos com peso molecular de 80 Kd, localizados nas células multipotentes da medula óssea, neutrófilos e células B (FUJIMASHI et al.⁷⁷, 1993). A produção de IL-6 é estimulada por IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF PTHrP, IL-1 e TNF. Em concentração fisiológica não estimula diretamente os osteoclastos maduros. Contudo, em alta concentração pode incitar o processo de reabsorção óssea por essas células. Admite-se que as células mielóides progenitoras dos osteoclastos podem ser estimuladas pelos fatores de crescimento IL-3, GM-CSF, M-CSF, ou G-CSF e produção de IL-6 (HEYWORTH et al.⁹⁶, 1990).

Por meio de um mecanismo dependente da síntese endógena de IL-1, a IL-6 reduz o período G₀ do ciclo celular, dotando as células progenitoras mielóides dos osteoclastos, da capacidade de responder ao estímulo proliferativo proporcionado pelos referidos fatores de crescimento. Mediante efeito autócrino a IL-6 pode induzir a

diferenciação dessas células em osteoclastos aumentando conseqüentemente a reabsorção óssea. Também, interfere na formação óssea, pois inibe a síntese do colágeno e das proteínas não colagênicas (ROSOL&CAPEN ¹⁹²,1992; LORENZO ¹³⁵,1991).

A produção dessa citocina é influenciada por hormônios esteróides como o 17- β -estradiol, que inibe ao nível da transcrição gênica a produção da IL-6 pelas células osteoblásticas. O mecanismo responsável por esse efeito é a ligação do 17- β -estradiol ao receptor para o estrogênio, resultando na inibição da atividade do gene promotor daquela citocina. O oposto pode ser constatado em todas as situações em que ocorra a perda do ovário, uma vez que ocorre o aumento da produção da IL-6 e da reabsorção óssea (BELLIDO et al. ¹³, 1995).

Nesse estudo foi demonstrado que a secreção da IL-6 aumenta na medula óssea após a menopausa, ocorrendo o estímulo da proliferação das células progenitoras dos osteoclastos e o aumento da formação dessas células no osso trabecular. Como as células da medula óssea apresentam receptores tanto para androgênios como para estrogênios, que ao serem ativados inibem a produção da IL-6, sugere que o mecanismo responsável pela perda óssea causada pela deficiência de androgênios nos homens seja semelhante a perda óssea causada pela deficiência dos estrogênios nas mulheres.

A presença da IL-6 no tecido gengival inflamado indica que essa citocina esteja relacionada ao início e a progressão da doença periodontal. Inflamatória. TAKAHASHI et al. ²²⁵ (1994) demonstraram que os fibroblastos, células endoteliais e as células epidérmicas são a principal fonte dessa citocina no tecido periodontal inflamado. Entretanto, como havia muitas células T nas proximidades das células que produziram IL-6, esses autores sugeriram que a produção dessa citocina poderia ser regulada por linfocinas como a IL-2, IL-4 e IFN- γ produzidas pelos linfócitos T. Portanto, é possível que as células do tecido conjuntivo como os fibroblastos e as células endoteliais, por produzirem IL-6, estejam diretamente relacionadas com a progressão da doença periodontal, particularmente, ao estágio de diferenciação das células B, visto que essa citocina é essencial para a diferenciação terminal das células B ativadas em plasmócitos, produtores de IgG e IgA (FUJISHASHI et al. ⁷⁷, 1993).

Atualmente, sabe-se que a expressão de genes para a IL-6 e outras citocinas relacionadas às respostas inflamatórias não imune e imune, esteja relacionada à participação dos fatores de transcrição. Nesse particular, destaca-se a participação dos fatores NF-IL6 e do fator NF kappa B (sub-unidade p65), que ligados determinam a produção da IL-6. RAY & PREFONTAINE ¹⁸⁴ (1994) demonstraram que o mecanismo antiinflamatório da dexametasona se deve, em parte, a sua ligação aos receptores que estão unidos aos receptores para a Nk-kappa B, impedindo a sua ligação ao fator NF-IL6, resultando na inativação gênica da IL-6, impedindo a síntese do RNAm.

Na doença periodontal inflamatória, também, há um aumento da metabolização da ¹⁴C-tetosterona para 5 α -Dihidrotestosterona (DTH) e 4-androtenediona pelo tecido

gingival, que segue uma relação direta com a severidade do processo inflamatório, verificada pelo aumento da expressão gênica para o receptor do androgênio nos fibroblastos presentes no tecido inflamado. O DTH estimula a síntese da matriz extracelular dos tecidos conjuntivo e ósseo, pois ao duplicar a concentração de ácido hialurônico afeta as glicoproteínas nele presente. O fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) pode estimular os receptores para os androgênios localizados nos fibroblastos, células endoteliais e pericitos presentes naquele tecido, estimulando a síntese do DTH e a formação do tecido mesenquimal, tais como colágeno, osso e cemento. Por outro lado, os androgênios regulam a biosíntese das cisteína proteases, catepsinas B e L que participam ativamente da destruição tecidual. Portanto, no contexto dessa doença, considerando que tanto o DTH como IGF estão relacionados com a síntese pelos fibroblastos das proteínas não colagênicas características do reparo inflamatório, a significativa estimulação do DTH pelo IGF, no tecido gengival e em cultura de fibroblastos, é sugestiva do processo de reparo mediada pelos androgênios (KASASA & SOORY¹¹³, 1995).

O fator necrótico tumoral (TNF- α) secretado por macrófagos ativados e o fator de necrose tumoral (TNF- β) derivado dos linfócitos TH₁ subclone CD4⁺ ativados por mitógenos ou antígenos, foram primeiramente identificadas por sua capacidade de causar necrose das células neoplásicas (BERESINI; LEMPET; EPSTEIN¹⁴, 1988). Atualmente, sabe-se que essas citocinas agem em vários outros tecidos não neoplásicos como o tecido ósseo, no qual o TNF- α e o TNF- β podem ser produzidos pelas células nele presente, participando das interações celulares fisiológicas desse tecido.

Na doença periodontal inflamatória, a produção dos TNFs pelos macrófagos é estimulada pelos LPS componentes da parede celular de bactérias gram negativas, principalmente, na presença do IFN- γ . Além dessas células e dos linfócitos presentes no local de reabsorção, os osteoblastos são igualmente capazes de produzi-los, determinando o aumento considerável da produção dos TNFs, mediante a estimulação por IL-1 e pelo fator estimulador de colônia (GM-CSF) macrófago/granulocítico (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992).

Estudos de STACHENKO et al.²²¹ (1991) demonstraram a relação da produção do TNF com a da IL-1 β . Com base nas semelhanças do efeito e estrutura de ambas citocinas, o autor sugeriu a possibilidade da IL-1 β e do TNF ligarem-se aos mesmos receptores (PAGE¹⁷⁰, 1991). *In vivo*, o TNF analogamente a interleucina-1 (IL-1) estimula a reabsorção óssea, pois induz a proliferação das células progenitoras de osteoclastos influenciando a sua maturação (MEGHJI¹⁵⁰, 1992). É possível que o estímulo proliferativo inicial dessas células, igualmente, ao que ocorre com os osteoblastos, possa ser causado pela inibição proporcionada pelo TNF- α da atividade da adenilciclase induzida pelo PTH e PTHrP (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992). Entretanto, ainda, existem pontos obscuros em relação a esse mecanismo.

Como sabemos há uma relação direta entre a produção dessa citocina e de PGE₂. Sendo assim, tudo indica que esse prostanóide possa regular a expressão do TNF- α .

Possivelmente, o mecanismo envolvido seja a inibição da transcrição do mRNA para o $\text{TNF-}\alpha$ pela concentração elevada da PGE_2 , via ativação da adenilciclase e aumento do AMPc . O fato de diferentes concentrações de PGE_2 determinarem em relação à produção do $\text{TNF-}\alpha$ diferentes respostas metabólicas, indica que os macrófagos possuam dois tipos de receptores para diferentes concentrações da PGE_2 (SOMERS & ERICKSON²¹⁵, 1994).

Devemos, ainda, ressaltar a importância da relação entre os macrófagos e os fibroblastos presentes no tecido inflamado, pois várias citocinas de origem macrófágica, tais como a IL-1 e o TNF participam do processo de reabsorção óssea, pois têm o seu efeito potencializado pelo $\text{IFN-}\gamma$ estimulando os fibroblastos a produção da PGE_2 , AMPc , $\text{TGF-}\beta$ e do ativador do plasminogênio e metaloproteinases latentes (PAGE¹⁷⁰, 1991). Vários outros produtos biologicamente ativos liberados pelos macrófagos ativados, como os fatores de crescimento e as citocinas, conjuntamente com os polipeptídeos liberados pela fragmentação da matriz orgânica óssea são capazes de estimular a síntese de colagenase pelos fibroblastos, exacerbando a doença periodontal.

Os antígenos bacterianos presentes na placa bacteriana dental, por produzirem reações de natureza imunopatológicas, ativam os linfócitos CD4 e as células NK para a produção do $\text{INF-}\gamma$, que entre outros efeitos biológicos pró-inflamatórios, ativa os macrófagos os induzindo a expressão das moléculas do complexo maior histocompatibilidade principal (HLA) e dos receptores para IL-2 , TNF e para a molécula da aderência intercelular (BERESINI; LEMPERT; EPSTEIN¹⁵, 1988). Por outro lado, a liberação do $\text{INF-}\gamma$ no local de reabsorção ao contrário da IL-1 e do TNF que estimulam a síntese de proteínas não colagênicas ósseas, por meio de um mecanismo independente da síntese de prostaglandinas inibe a síntese dessas proteínas, podendo, no tecido ósseo, inibir a reabsorção mediada por osteoblastos, pois impede a proliferação e a diferenciação das células mielóides progenitoras dos osteoclastos (MEGHJI¹⁵⁰, 1982). Pode, também, inibir os efeitos estimuladores da $1, 25 (\text{OH})_2$ vitamina D , PTH e IL-1 na formação dessas células (LORENZO¹³⁵ 1991).

O gama-interferon ($\text{INF-}\gamma$) age sinergicamente com os produtos de origem bacteriana estimulando os macrófagos a expressão de genes necessários à formação da enzima oxido-nítrico-sintetase, capaz de contribuir para atividade citotóxica e antimicrobiana dessas células. (BOGDAN²⁰, 1993). Além do mais, os INFs , também, induzem a síntese de muitas proteínas e enzimas cujas funções no processo inflamatório permanecem desconhecidas (BERESINI; LEMPERT; EPSTEIN¹⁴, 1988).

PAGE¹⁷⁰ (1991) ressaltou que o $\text{INF-}\gamma$, por aumentar a produção da IL-1 estimulada por lipopolissacarídeos e potencializar o efeito do $\text{TNF-}\alpha$ na ativação dos macrófagos, pode induzir essas células a produção de elastase, proteases ácida e das metaloproteinases latentes, que ao serem ativadas são capazes de estimular a degradação da matriz extracelular. Em contraposição, WAHL & CORCORAN²⁴⁷ (1993) demonstraram que o gama-interferon ($\text{INF-}\gamma$) e a interleucina-4 (IL-4) secretada pelos linfócitos T ativados, por inibirem a síntese dos eicosanóides inibem a produção de

metaloproteinases pelos macrófagos. Segundo esses autores, tais citocinas respectivamente impediriam a ativação da fosfolipase e da prostaglandina sintetase, impedindo a produção do AMPc necessário à ativação da enzima ornitina-descarboxilase, bloqueando assim, a produção da putrescina e a conseqüente ativação das metaloproteinases.

Além dessa inibição enzimática, o efeito inibidor da reabsorção óssea atribuído a IL-4, pode ser decorrente da inibição da produção do TNF, IL-1, IL-6 pelos monócitos, bem como do estímulo dessas células a secreção do fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF), que, reconhecidamente, é um potente inibidor da reabsorção óssea osteoclástica, pois não estimula crescimento das células progenitoras mielóides dos osteoclastos. Também, age nos osteoblastos inibindo a síntese e secreção da IL-6, IL-1 e de M-CSF. Uma outra possibilidade é o efeito inibidor direto do recrutamento osteoclástico e/ou da atividade dos osteoclastos maduros (WATANABE et al.²⁵¹, 1993).

As PGs são importantes na indução do estado de ativação dos macrófagos. WAHL²⁴⁸ et al. (1977) demonstraram que a síntese de collagenase pelos macrófagos estimulados por endotoxina ou macrófagos tratados com linfocinas era dependente da concentração de PGE endógena. DAVIDOVITCH et al.⁴¹ (1982); LEE¹²⁸ (1990); YAMASAKI; MIURA; SUDA²⁰³ (1980) demonstraram que as prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) sintetizadas e secretadas pelos macrófagos e demais células presentes no local da inflamação, ativam a adenilciclase aumentando o nível intracelular de AMPc e de Ca²⁺, provavelmente, secundário à estimulação da fosfolipase C. Tais produtos participam do mecanismo da reabsorção óssea como segundos mensageiros. Além do mais, o aumento da concentração intracelular do AMPc induzida pela PGE₂ é necessária para a atividade dos genes responsáveis pela produção das citocinas reabsortivas IL-1 β , IL-6 e TNF- α (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993).

O efeito desse mediador torna-se evidente pela adição da indometacina na cultura de macrófagos, uma vez que o fármaco induz o estado de inativação dessas células, caracterizado pela bloqueio da síntese de PGs e da síntese e secreção de collagenases. Essa inibição pode ser revertida pela adição da PGE₁ e da PGE₂ na cultura. Todavia, outros estudos demonstraram que o estado de ativação está inversamente relacionado com a produção da PGE₂ e PGI₂.

LIM et al.¹³⁰ (1983), BONTA et al.²² (1984) e SCHULTZ et al.²⁰⁶ (1979) demonstraram que o estímulo da enzima adenilciclase pelas PGs causa inativação dos macrófagos evidenciado pela diminuição da produção de enzimas lisossomais. Portanto, fármacos antiinflamatórios esteróides e não esteróides, que interferem no estado de ativação dos macrófagos, influenciam o metabolismo ósseo. Nesse particular, demonstrou-se que os inibidores da ciclooxigenase ativam os macrófagos (SCHENKELAARS & BONTA²⁰³, 1986; SCHULTZ et al.²⁰⁶, 1979), enquanto que os inibidores da lipooxigenase inibem essas células (SCHENKELAARS & BONTA²⁰³, 1983).

No local da reabsorção, além de causarem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e a inibição da liberação de linfocinas pelos linfócitos T, estes prostanoídes agem de maneira autócrina regulando a proliferação fibroblástica e a produção do fator beta transformador do crescimento (TGF- β). Esse fator, por meio de um mecanismo indireto que produz o aumento local de PGE₂, também, induz a reabsorção óssea (RAISZ¹⁸², 1988).

O efeito local das prostaglandinas produzidas no tecido inflamado pode ser exacerbado por vários microorganismos presentes na placa bacteriana dental, dentre eles o *Bacterioides melanogenicus* pode sintetizar a enzima fosfolipase A₂, capaz hidrolisar os fosfolípidios das membranas celulares, aumentando concentração de PGs e LTs no periodonto inflamado. Outros microorganismos como o *A. actinomycetemcomitans*, também, produzem fatores diretos (glicoproteínas) de reabsorção, que, indiretamente, estimulam a síntese endógena das PGs, contribuindo para o processo de reabsorção óssea presente na doença periodontal (HARVEY⁸⁸, 1983).

A participação das PGs nesse processo foi comprovada em estudos com cachorros da raça "beagle" onde fármacos inibidores da ciclooxigenase reduziram a perda óssea (WILLIAMS et al.²⁵⁴, 1987). A possível explicação para esse efeito pode ser a redução do nível local de PGE₂ produzida pelo fármaco, tendo como consequência a inibição da produção do fator solúvel de natureza lipídica produzido pelos osteoblastos, capaz de estimular a reabsorção óssea pelos osteoclastos (MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

Em consonância com esse estudo, McALLISTER et al.¹⁸¹ (1995) demonstraram que as prostaglandinas são inibidoras da proliferação dos fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal, bem como das células mesenquimais indiferenciadas perivasculares do tecido ósseo, possivelmente em decorrência do aumento do AMPc impedindo a passagem fase G1 para S do ciclo celular. Por outro lado, a PGE₁ *in vivo* aumenta a massa óssea mandibular em cães da raça "beagle". Assim sendo, o emprego de anti-inflamatórios, por meio de mecanismos inibidores dos moduladores da proliferação celular, dependentes da dose e do tempo, poderão ser utilizados para bloquear tanto a formação como a reabsorção óssea.

Nesse particular, McALLISTER et al.¹⁴⁵, 1995 relataram que a associação entre PDGF e dexametasona, por inibir a síntese e secreção dos eicosanóides induz a regeneração do periodontal, possivelmente, explicado pelo efeito potencializador desse fator de crescimento apresentado pelo fármaco (ROTHE & FALANGA¹⁹³, 1992). A indometacina por diminuir a concentração intracelular do AMPc, possibilitando a ativação da proteína quinase, pode estimular a resposta celular proliferativa sem influenciar negativamente o processo de mineralização. Todavia, como as prostaglandinas, também, são importantes no início do processo da mineralização, uma vez que as PGs aumentam a concentração intracelular do cálcio, além de serem necessárias ao processo de diferenciação osteoblástica a administração desse fármaco durante a fase inflamatória inicial pós-cirúrgica deve ser evitada.

Os produtos da 5-lipooxigenase como LTB_4 e o LTD_4 presentes no local da inflamação crônica, também, participam ativamente do processo da reabsorção óssea, presente na doença periodontal, pois além de estimularem a produção do fator ativador dos osteoclastos (IL-1) pelos macrófagos e demais células presentes na área de inflamação, são quimiotáticos para neutrófilos e linfócitos exacerbando o referido processo (SCHENKELAAR & BONTA²⁰³, 1986). Os leucotrienos, também, assumem importância fundamental no estímulo dos macrófagos à produção de enzimas lisossomais (FEUERSTEIN; FOEGH; RAMWELL⁶⁸, 1981).

Como mencionamos anteriormente vários fatores locais (ILs, TNF, TGF, PGs...) participam do controle local do processo osteolítico. Atualmente tem sido atribuída acentuada importância à proteína relacionada ao hormônio paratiroideano (PTHrP). Segundo ROSOL & CAPEN¹⁹² (1992) esse hormônio devido à sua semelhança estrutural com o PTH poderia ocupar os receptores para esse hormônio, resultando na estimulação da fosfolipase C e da adenilato ciclase nas células alvo presentes em vários tecidos, entre os quais: ossos, rins, pele, fígado, glândulas paratireóides, tecido conjuntivo e tecido linfóide, aumentando nas células desses tecidos a concentração do AMPc, do inositol trifosfato (IP3) e do diacilglicerol (DAG).

Considerando que essas proteínas funcionam como segundos mensageiros necessários à ativação dos genes reguladores do crescimento (FELDMAN & YAAR⁶⁵, 1991). ROSOL & CAPEN²¹⁵ (1991) sugeriram que o PTHrP participa do controle da proliferação e da diferenciação celular. Em relação ao processo de reabsorção óssea o PTHrP apresenta efeito semelhante ao do PTH. A produção desse peptídeo é aumentada pelo fatores de crescimento epidérmico (EGF) e transformador do crescimento (TGF) e por fármacos bloqueadores da síntese protéica como cicloheximida. Essa última constatação sugere que o controle da transcrição do PTHrP envolve a participação de um repressor protéico que controla o gene operador do PTHrP. Por outro lado, os glicocorticóides inibem a síntese desse peptídeo (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992).

Os DIFs são moléculas de aproximadamente 43×10^3 Mr obtida por glicosilação de um núcleo de 19×10^3 Mr a partir de uma cadeia polipeptídica. São produzidos entre outras células por células inflamatórias, linfócitos, fibroblastos e osteoblastos (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992). Eles exercem a sua atividade biológica por meio de uma associação altamente específica com receptores de superfície com o número variando de 300 a 1500 por célula, semelhante aos receptores para linfocinas (IL-6).

A atividade biológica desses polipeptídeos depende basicamente das circunstâncias em que esse sinal é emitido para a célula alvo, e o contexto celular no qual o sinal foi interpretado. A análise do gene de transcrição do DIF/LIF em culturas de células tem mostrado a existência de duas classes de RNAm para DIF/LIF, que divergem na sequência 5 terminal. A significância funcional dessa organização é que o polipeptídeo DIF/LIF, contendo MKVLA na sequência amino-terminal é livremente difusível, podendo afetar o comportamento das células localizadas distantemente das células que o produziram, enquanto que a forma alternativa contendo a sequência aminoterminal MRCR,

é depositada na matriz celular das células que a produziram. Somente as células em contato com essas células é que poderão ser estimuladas por esse fator (HEATH et al.⁹³, 1990).

Na cultura do tecido ósseo da calota craniana dos camundongos, tais fatores demonstraram ser potentes estimuladores do processo da reabsorção e da síntese do DNA. Contudo, na cultura dos ossos longos de ratos, foi constatada a inibição da reabsorção óssea por esses fatores. Eles decrescem a atividade da fosfatase alcalina e aumentam o nível de RNA para osteopontina em células semelhantes a osteoblastos. Ao contrário do PTH, 1, 25 (OH)₂ vitamina D, IL-1 e TNF que estimulam os osteoclastos via produção de um fator solúvel produzido pelos osteoblastos, há evidências de que esses fatores estimulam diretamente a atividade reabsortiva dessas células (LORENZO¹³⁵, 1991).

Considerando que as endotelinas produzidas pelas células endoteliais e células musculares lisas da parede vascular, apresentam efeito mediado pelas prostaglandinas (PGs), podendo estimular tanto a reabsorção como o anabolismo ósseo, esses peptídeos apresentam função importante no acoplamento do processo do remodelamento ósseo, pois estimulam o processo de reabsorção ósseo no modelo da calota craniana; a síntese das proteínas colagênicas e não colagênicas em presença de indometacina; bem como aumentam o "turnover" na cultura de células ósseas (TATRAI et al.²³¹, 1992).

Na formação óssea, as células endoteliais que revestem os capilares produzem uma série de citocinas, que mediante um efeito parácrino influenciam o crescimento e o desenvolvimento ósseo. Por outro lado, vários produtos sintetizados e secretados pelas células ósseas, em particular os osteoblastos, igualmente, podem afetar as células endoteliais. Isso é facilmente compreensível, visto que os osteoblastos produzem PGE₂ e PGF₂ capazes de estimular as células endoteliais ao aumento da concentração intracelular de [Ca²⁺] e do AMPc provavelmente secundário a estimulação da fosfolipase C (IDA et al.¹⁰⁶, 1994).

Farmacologicamente, pode-se interferir no processo da reabsorção óssea. Estudos *in vitro* realizados em ratos nos quais foram administrados fármacos anti-inflamatórios esteróides (dexametasona) e não esteróides (indometacina) demonstraram que esses medicamentos por inibirem a produção de PGs, reduziram o número dos osteoclastos e das baías de reabsorção. Em nível molecular, a interrupção da síntese de PGs, impede o aumento da concentração intracelular de AMPc e do nível de cálcio necessários à diferenciação dos osteoblastos (YAMASAKI; MIURA; SUDA²⁶³, 1980). Os fármacos inibidores da lipooxigenase e os anti-inflamatórios não esteróides como o naproxeno e o tenidap por inibirem a produção da IL-1 e, conseqüentemente, o estado de ativação dos osteoclastos, podem reduzir mais acentuadamente o processo de reabsorção óssea (TATAKIS²³⁰, 1993).

Considerando, ainda, os trabalhos de CRONSTEIN³⁸ (1992); CRONSTEIN; NAME; OSTAD³⁹ (1984) e de WILLIAMS; TOPLEY, WILLIAMS²⁵⁸ (1993) que atribuem ao metotrexato efeito inibidor das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF) e dos eicosanóides (LTB4 e PGE2) estimuladores do processo de reabsorção óssea, bem como dos fatores estimuladores das colônias (CSFs) indutores da proliferação e diferenciação das células progenitoras mielóides dos osteoclastos, é possível que esse fármaco apresente acentuado efeito inibidor daquele processo. Por outro lado, a administração exógena de PGs estimula a reabsorção óssea *in vivo* (LEE 128, 1990).

3. PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho foi o de avaliar comparativamente, *in vivo*, no processo inflamatório agudo e crônico induzido por agentes flogógenos de diferentes intensidades (fraca, média e forte), o efeito dos fármacos antiinflamatórios esteróides (dexametasona), não esteróides (tenoxicam e indometacina) e de um medicamento citostático (metotrexato), aprofundando o estudo a respeito do mecanismo de ação desses fármacos e da estimulação flogógena, propondo um modelo alternativo para o teste de fármacos antiinflamatórios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Na realização do presente estudo foram utilizados 305 ratos, adultos da linhagem Wistar (*Mus norvegicus albinus*) de ambos os sexos, com o peso médio de 150 gramas, procedentes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, mantidos, durante o período experimental em gaiolas de material plástico devidamente identificadas, que possuíam dispositivos para alimento e água de beber de material inoxidável, desinfectadas duas vezes por semana.

Os animais permaneceram durante todo o experimento em ambiente ventilado, nas condições de umidade e temperatura na faixa saudável para a espécie e alimentados com ração balanceada da marca Anderson Clayton (n° 49) e água a vontade (*ad libitum*).

O modelo de estudo para cada agente flogógeno utilizado, no que se refere à avaliação do efeito dos medicamentos antiinflamatórios, foi realizado em um modelo que pode ser classificado de experimental simples, pois os grupos amostrais experimental e controle foram confrontados, procedendo-se, também, a comparação de dois agrupamentos de uma mesma amostra diversamente experimentados. Igualmente, analisamos o comportamento da amostra em função do tempo.

O estudo prospectivo compreendeu quatro grupos de animais que foram submetidos à tratamento e testados após esse tratamento, comparando-se os efeitos farmacológicos obtidos nos diferentes períodos experimentais entre si e com o grupo controle.

4.1 EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO AGUDO

Na indução do processo inflamatório agudo foram utilizados como agentes flogógenos a placa microbiana dental quimicamente preparada e carragenina, respectivamente, nas concentrações de 100 mg/ml e 10mg/ml de solução de Hanks e paracoccidioidina na diluição de 1:100 ml de solução fisiológica (0,9%).

Os animais dos grupos experimentais receberam os medicamentos (em dose única) por via oral mediante intubação gástrica trinta minutos antes da administração da solução do corante azul de Evans, na concentração de 1% em água destilada e na dose de 20 mg/kg de peso corporal por via intravenosa, em uma das veias laterais da cauda dos animais. imediatamente após a administração da solução do corante azul de Evans foi feita a inoculação dos agentes flogógenos (0,2 ml) no tecido subcutâneo da região dorsal superior dos animais, segundo o modelo da bolsa de ar. O metotrexato foi administrado por via intra-muscular.

O efeito antiinflamatório dos medicamentos antiinflamatórios esteróides e não esteróides tenoxicam (0,33mg/kg), dexametasona (0,066mg/kg), indometacina (1,666mg/kg) e metotrexato (0,833mg/kg), que adaptado ao metabolismo do rato foi multiplicado por 2, correspondendo, respectivamente, as doses de 0,66mg/kg, 0,133 mg/kg, 3,32 mg/kg e 1,66 mg/kg, foi avaliado nos períodos experimentais de 1 (fase inicial), 3 e 6 horas (fases tardias) após a estimulação flogógena, empregando-se o teste edemogênico no qual analisamos espectrofotometricamente o corante azul de Evans (A.E.) ligado às proteínas extravasadas no foco inflamatório.

O cálculo dessas doses teve por base a seguinte regra de três simples:

$$\begin{array}{lcl} \text{PCH (mg)} & \dots\dots\dots & \text{DMD (mg)} \\ \text{PCR (mg)} & \dots\dots\dots & \text{X (mg)} \end{array}$$

onde:

PCH = peso corporal humano = 60 kg = 60.000.000 mg
 PCR = peso corporal do rato = 150 g = 150.000 mg
 DDM = dose diária do medicamento em humanos
 X = dose diária do medicamento adaptada ao peso do rato

Em cada período experimental, para cada medicamento, foram utilizados 25 animais (5 controles e 20 para as 4 drogas testadas), totalizando nos três períodos experimentais 75 animais por agente flogógeno.

Considerando que no teste edemogênico foram utilizados três agentes flogógenos, o número total de animais usados no teste foi 225.

4.1.1. PREPARO DOS AGENTES FLOGÓGENOS

4.1.1.1. PREPARO DA PLACA MICROBIANA DENTAL

A placa dental foi coletada de escolares na faixa etária compreendida entre os 7 e 14 anos e depositada em tubos de ensalo contendo solução fisiológica a 0,9% acondicionados em um recipiente de isopor contendo gelo moído, tendo sido, posteriormente, suspensa com auxílio de um misturador automático*. Logo a seguir, foi centrifugada* a 4 °C por 10 minutos e a fração do sedimento acondicionado em

"freezer" na temperatura de -20°C . Desse precipitado, pesamos o equivalente de placa necessário a inoculação de 10 mg por animal. O tubo de ensaio contendo esse material foi introduzido em um cilindro contendo nitrogênio líquido por 10 minutos, findo os quais foi adicionado SDS a 2% no dobro do peso, mergulhado em água fervente por 10 minutos e após ter permanecido na temperatura ambiente por 2 horas, foi centrifugado por 20 minutos a 3.000 rpm. Adicionamos 20 ml de TPF com $\text{ph} = 7,5$, homegeinizamos e submetemos o tubo contendo a suspensão novamente a centrifugação por 20 minutos a 3.000 rpm. Esse passo foi repetido por 3 vezes, após os quais foi tratada com 20 ml de TPF, 10 mg de ribonuclease e 20 mg de deoxiribonuclease, permanecendo por 12 horas na temperatura de 37°C . A suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 3.000 rpm e o sedimento lavado 3 vezes com TPF e adicionado 20 ml de solução de SDS-fenol, permanecendo na temperatura ambiente por 2 horas. Centrifugar por 20 minutos a 3.000 rpm, resuspender em TPF e centrifugar por 20 minutos, repetindo essa etapa por 4 vezes. Resuspender a placa em álcool-éter a 50% e centrifugar por 30 minutos a 3.000 rpm, repetindo esse passo por 3 vezes. Lavar novamente com TPF e centrifugar a 3.000 rpm. Esse passo deve ser repetido por 3 vezes.

Esses procedimentos tiveram por finalidade a purificação protéica, ou seja, eliminar as proteínas de alto e baixo peso molecular e os lipídeos. Logo após ao processamento, adicionamos solução de Hanks, à parte do precipitado obtido, até atingir a concentração de 100 mg/ml.

4.1.1.2. PREPARO DA SUSPENSÃO DE CARRAGENINA (1%)

Para o preparo da suspensão de carragenina, adicionamos 10 mg de carragenina em 10ml de solução de Hanks****, sendo em seguida, homogeneizada em um misturador automático**, inoculando-se o volume de 0,2 ml.

4.1.1.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE PARACOCCIDIODINA

A solução de paracoccidioidina***** foi preparada na diluição de 1:1000 ml de solução fisiológica e inoculada no volume de 0,2 ml.

Posteriormente ao estímulo flogógeno, e decorrido os períodos experimentais de 1, 3 e 6 horas, todos os animais dos grupos controle e experimentais foram sacrificados

* Centrifuge Internacional - USA)

** Misturador automático B1 (Tatyo Bussan Co. Ltd.)

*** Carragheenan, type I, SIGMA - Chemical Company

**** Meio de cultura - DIFCO LTDA

***** (Reagentes Biológicos Pimenta Abreu LTDA)

por inalação de éter sulfúrico, procedendo-se a seguir, a tricotomia manual e com o auxílio de um "punch" metálico de 23 mm de diâmetro, a remoção do tecido corado pelo azul de Evans.

As peças obtidas foram cortadas em pequenos fragmentos, que, após recolhidos em frascos de vidros contendo 4 ml de formamida para extração do corante, permaneceram em estufa na temperatura de 45°C por 3 dias.

A avaliação do exsudato inflamatório foi realizada, mediante a análise (absorbância) espectrofotométrica (630 nm) do corante extraído desse exsudato, segundo a técnica de (UDAKA et al.²³⁷, 1970), utilizando-se para o cálculo da concentração (em µg) do corante, a seguinte fórmula:

$$[A.E.] = X \times FD \times VF,$$

onde:

X- média aritmética das absorbâncias do corante A. E.

FD- fator de concentração do corante

VF- volume da solução extratora (formamida) = 4ml

O percentual de inibição do exsudato inflamatório apresentado pelos fármacos testados foi calculado por meio de uma regra de três simples, onde:

$$\begin{array}{rcl} [A.E.C.] & \text{-----} & 100\% \\ [A.E.F.] & \text{-----} & X \end{array}$$

$$X\% = 100 - x$$

[A.E.C]= Concentração do corante A. E. no grupo controle

[A.E.F]= Concentração do corante A. E. no grupo medicado

X= percentual do corante A. E.

X%= Percentual de inibição proporcionada pelo fármaco

4.2 EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO CRÔNICO

Na avaliação do efeito antiinflamatório crônico, *in vivo*, dos medicamentos tenoxicam, indometacina e dexametasona foi empregado o teste da indução dos granulomas experimentais, inoculando-se a suspensão de PMD e óleo de milho (10mg/ml), no tecido subcutâneo, segundo o modelo da bolsa de ar localizada nas regiões anterior e posterior lateral do dorso dos ratos. A título de comparação, também, foi avaliado na evolução dos granulomas, o efeito antiinflamatório de uma droga citostática (metotrexato), que foi administrada por via intramuscular três vezes por semana, na dosagem já referida.

Os medicamentos antiinflamatórios esteróides e não esteróides foram administrados diariamente, por meio de intubação gástrica, em uma única dose, sempre no mesmo horário em concentrações equivalentes as utilizadas na terapêutica humana convencional (já referidas) e adaptadas ao peso corporal do rato.

A ação desses fármacos e dos seus possíveis mecanismos de ação foram estudadas nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, mediante a análise dos pesos úmido, seco e diferencial, assim como pelo estudo da densidade de volume (Vvi) das diferentes estruturas constituintes dos granulomas. Para cada período experimental foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar de ambos os sexos (4 controles e 16 para as 4 drogas testadas), totalizando 80 animais.

Ao término dos períodos experimentais, os animais foram sacrificados por inalação de éter etílico, removendo-se imediatamente os granulomas. Com o objetivo de tornar mais precisa a sua avaliação, realizamos uma padronização da localização, ou seja:

1- os granulomas localizados na região dorsal ântero-lateral foram encaminhados ao processamento histotécnico e utilizados no estudo da densidade de volume (Vvi) ocupado pelas diferentes estruturas constituintes dos granulomas.

2- os granulomas localizados na região dorsal póstero-lateral foram pesados e empregados na análise do efeito dos fármacos nos componentes exsudativo, celular e fibroso dos granulomas, por meio da análise dos pesos úmido, seco e diferencial.

4.2.1. DETERMINAÇÃO DO PESO ÚMIDO

Após a remoção, cada granuloma foi pesado em uma balança de precisão*, considerando-se como peso úmido, o peso do granuloma recém-extraído do animal. Esse peso nos informou o peso total, ou seja, o peso das células, das fibras e do edema inflamatório.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

A aferição desse peso teve por finalidade avaliar a participação do componente proliferativo (células) do granuloma e das fibras. Foi considerado como peso seco, o peso obtido após a permanência do granuloma em estufa à temperatura de 70°C por 15 horas.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DO PESO DIFERENCIAL

Esta determinação teve por objetivo obter parâmetros para a análise do componente exsudativo (edema inflamatório) presente no granuloma. O peso diferencial foi obtido mediante a diferença entre os pesos úmido e seco.

4.2.4. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE VOLUME DO GRANULOMA

Imediatamente após a remoção, os granulomas da região dorsal ântero-lateral foram colocados em frascos de vidro devidamente identificados contendo solução fixadora de formol neutro a 10%, onde permaneceram por 24 horas.

Completada a fixação, os granulomas foram submetidos ao processamento histotécnico e corados pelos métodos da hematoxilina e eosina (H.E.) e do Tricrômico de Mallory.

Nos cortes histológicos com espessura de 6 μ m obtidos ao acaso de cada granuloma, procedemos à contagem do número de campos presentes em todo o corte histológico. A seguir, dividimos o número total de campos pelo número de campos que foram contados (20).

O número encontrado correspondeu ao número de campos microscópicos desprezados -que variou segundo o tamanho do espécime -, a fim de obtermos uma amostra representativa e não "viciada" de todas as regiões do granuloma nos cortes histológicos (casualização sistemática).

Nos 80 campos microscópicos anteriormente analisados descritivamente, com base na casualização, procedemos à contagem dos pontos coincidentes com os contornos celulares dos macrófagos e das células que se assemelhavam aos macrófagos, das fibras colágenas, do tecido de granulomatoso e da região central de necrose.

* Balança de precisão (E. Mettler, Tipo H15, Zurich)

Essa contagem foi realizada com o auxílio uma de ocular kpl 8x da Zeiss, com grade de 100 pontos e uma objetiva de 40 x, segundo o método point counting de CHALKLEY³⁰(1943) apud AHERNE² (1967). Essa técnica nos permitiu calcular a densidade de volume (V_{vi}) ocupada pelas estruturas do granuloma, mediante à aplicação da seguinte fórmula:

$$V_{vi} = \frac{PI}{Pt}$$

onde:

V_{vi}= densidade de volume

pt= no. de pontos sobre o granuloma PI= no. de pontos sobre a estrutura

Essa contagem, também, possibilitou-nos calcular nos cortes processados o volume (em μm^3) da estrutura presentes nesses cortes. Para tanto, empregamos a regra de três simples:

$$\begin{array}{lcl} 100 \text{ pontos} & \text{-----} & A \text{ (área de do retículo)} \\ PI & \text{-----} & X \text{ (área de superfície da estrutura em } \mu\text{m}^2) \end{array}$$

onde:

PI = número de pontos coincidentes com a estrutura

4.2.4.1. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO RETÍCULO (A)

Utilizando uma lâmina micrométrica de 1 mm, dividida em 100 intervalos de 0,01 mm (10 μm), ajustada sobre a mesa de um microscópio da marca Olympus, em aumento de 40x, adaptado com uma ocular de compensação, da Zeiss KPL 8x, com retículo de

Integração II de 100 pontos e 10 linhas paralelas, fizemos coincidir o zero da escala com o lado esquerdo do retículo.

A seguir, observamos que em 30 μm havia coincidência entre os traços maiores da escala e o primeiro ponto do retículo. Essa medida correspondeu à distância entre os pontos do retículo.

Como a primeira linha do retículo contém 10 pontos, essa medida multiplicada por 10 nos forneceu o comprimento da primeira linha do retículo (300 μm), que adicionada de 30 μm (correspondente a distância entre os lados do retículo e a primeira linha), informa o comprimento de um dos lados do retículo (330 μm).

Considerando que o retículo é um quadrado, bastou-nos elevar um dos lados ao quadrado (330 μm)² para obtermos a área total de 108900 μm^2 .

4.2.4.2. CÁLCULO DO VOLUME DA ESTRUTURA A PARTIR DA ÁREA DO RETÍCULO

A determinação do volume da estrutura no corte histológico foi obtida multiplicando a área de superfície da estrutura (calculada através da regra de três simples) pela espessura do corte (6 μm), segundo a fórmula:

$$V = X \times E$$

onde:

V= volume da estrutura no corte histológico

X= área de superfície da estrutura (μm^2)

E= espessura do corte histológico (6 μm)

Para obtermos o volume total da estrutura nos cortes histológicos analisados, bastou-nos multiplicarmos o valor de V pelo número de cortes histológicos observados, que no presente estudo foi quatro (4).

4.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

Os dados para o presente estudo são apresentados em tabelas à parte, para facilitar a interpretação dos resultados.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base na seguinte fórmula:

$$N = n_0 / 1 + n_0/N_1,$$

onde:

N = tamanho final da amostra
n₀ = estimativa inicial do tamanho da amostra
N₁ = tamanho da população

onde:

$$n_0 = \frac{(Z)^2 \times (P \times Q)}{(P-p)^2}$$

P-p = erro de amostragem (3%)
P = probabilidade de que ocorra prevalência já conhecida (95%)
Q = probabilidade de não ocorrer (100 - P)
Z = nível de confiança de 95% (1,96)

Considerando que trabalhamos com 5 grupos independentes, amostras relacionadas e com dados em escala ordinal (postos), objetivando estudar o efeito dos fármacos em relação às quatro características microscópicas estudadas em um mesmo grupo, empregamos no tratamento estatístico dos resultados o teste não paramétrico de Friedman para a comparação entre os grupos. Quando significativo utilizamos o teste das comparações múltiplas para verificar as diferenças significativas entre eles.

No teste estatístico de Friedman empregamos a seguinte fórmula:

$$X_r^2 = \frac{12}{NK(K+1)} \sum (Ri)^2 - 3N(K+1)$$

onde:

N = número de linhas

k = número de colunas

Ri = soma dos postos na coluna

Σ = somatório dos quadrados da soma de postos sobre as **k** condições

Para o cálculo da diferença entre os grupos (DMS), empregamos as seguintes fórmulas:

1) Cálculo do DMS em relação a densidade de volume de macrófagos e fibroblastos, do tecido granulomatoso e da região central, considerando-se o efeito antiinflamatório:

$$\text{DMS } 5\% = Q \times \sqrt{nk(k+1)/8} = \underline{43,20}$$

onde:

$$Q = 2,160$$

$$n = 80$$

$$k = 5$$

2) Cálculo do DMS em relação a densidade de volume de macrófagos e fibroblastos, do tecido granulomatoso e da região central, considerando-se o tempo:

$$\text{DMS } 5\% = Q \times \sqrt{nk(k+1)/12} = \underline{68,58}$$

onde:

$$Q = 5,94$$

$$n = 80$$

$$k = 4$$

Como no período experimental de 14 dias, na análise da densidade de volume das fibras colágenas do granuloma, no grupo medicado com dexametasona, somente analisamos 66 campos microscópicos, para comparar a média de mais de dois grupos, aplicamos o teste paramétrico da análise de variância com um número diferente de repetições. Para isso, empregamos a seguinte fórmula:

$$F = QMTr / QMR$$

onde:

$$QMTr = 387,06$$

$$QMR = 49,90$$

O Teste $F = 7,756^*$ foi considerado significativo, visto que o valor para o teste F para $\alpha=5\%$ com 4 graus de liberdade para tratamentos (numerador) e 382 graus de liberdade para resíduo (denominador) é 2,37. Esse dado indicou-nos que as médias não eram iguais.

Para a comparação entre os grupos, com o objetivo de verificar se as médias dos grupos estudados eram ou não estatisticamente iguais, com exceção do grupo medicado com dexametazona empregamos o teste de Tukey, que permite estabelecer a diferença mínima significativa (d. m. s.), com base na seguinte fórmula:

$$d. m. s. = q \sqrt{1/80 + 1/80} \times QMR/2$$

onde:

$$q = 3,86$$

$$QMR = 49,20$$

$$d. m. s. = \underline{3,04}$$

Para compararmos o grupo controle, bem como os demais grupos medicados com o grupo medicado com dexametasona, calculamos a diferença mínima significativa (d.m.s.) com base na seguinte fórmula:

onde:

$$q = 3,86$$

$$QMR = 49,90$$

$$d.m.s. = \underline{3,04}$$

O teste F para o estudo do efeito dos medicamentos em função do tempo, foi calculado com base na seguinte fórmula

$$F = QMTr / QMR$$

onde:

$$QMTr = 3549,23$$

$$QMR = 29,56$$

O resultado do teste $F = 101,00^*$ foi significativo, uma vez que o valor de F para $\alpha = 5\%$ com 3 graus de liberdade de tratamentos (numerador) e 306 graus de liberdade do resíduo (denominador) é 2,60, indicando que as médias não eram iguais.

O valor do d.m.s. para comparação entre períodos experimentais de 7, 21 e 28 dias com o período de 14 dias, no grupo medicado com dexametasona, foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$d.m.s. = q \sqrt{1/80 + 1/66} \times Qmr/2$$

onde:

$$q = 3,31$$

$$QMR = 138,63$$

$$d.m.s. = \underline{4,57}$$

Para a comparação do efeito da dexametasona nos períodos de 7, 21 e 28 dias, o d.m.s. calculado foi baseado na seguinte fórmula:

$$d.m.s. = q \sqrt{1/80 + 1/80} \times QMR/2$$

onde: $q = 3,31$

$QMR = 138,63$

$d.m.s. = \underline{4,36}$

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO AGUDO

5.1.1. MODELO EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA SUSPENSÃO DE CARRAGENINA E SOLUÇÃO (MEIO DE CULTURA) DE HANKS

Nesse modelo, as quatro drogas testadas apresentaram efeito antiinflamatório. A análise do efeito antiinflamatório dos medicamentos em função do tempo apontou diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 1 e 3 horas, indicando que os fármacos, nesse período experimental, agiram mais acentuadamente. No período compreendido entre 3 e 6 horas diminuíram de potência (TABELA 4), pág. 101

No período experimental de 1 hora, o metotrexato apresentou maior potência antiinflamatória, inibindo 31,73% do exsudato corado pelo azul de Evans, seguido pela indometacina (9,30%), dexametasona (5,07%) e tenoxicam (-2,41%) (TABELA 4; GRÁFICO V), pág. 101 e 109.

Decorrido o intervalo de 3 horas, as quatro drogas apresentaram potência máxima, destacando-se, o metotrexato (80,41%) e a indometacina (64,05%). Neste período, o efeito produzido pelo tenoxicam (54,26%) foi discretamente superior ao da dexametasona (46,35%) (TABELA 4; GRÁFICO IV).

Na fase de permeabilidade tardia (6 horas), as drogas mais potentes foram o metotrexato (49,10%) e a dexametasona (36,92%), seguidas em ordem decrescente de potência pela indometacina (18,14%) e pelo tenoxicam (4,67%) (TABELA 4; GRÁFICO IV).

5.1.2. MODELO EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA SUSPENSÃO DA PLACA MICROBIANA DENTAL E SOLUÇÃO DE HANKS

A análise dos dados constantes na tabela 1 e do tratamento estatístico realizado demonstrou que o agente flogógeno nas diferentes concentrações administradas apresentou potência inflamatória produzindo estímulo crescente, que se tornou mais acentuado às 6 horas (TABELA 1; GRÁFICO I), pág. 99 e 108

Em relação a intensidade do estímulo flogógeno, podemos observar que as concentrações de 100, 250, e 500 mg de PMD/ml em solução de Hanks, nos períodos experimentais de 1 e 3 horas apresentaram praticamente a mesma potência flogógena. Entretanto, no período de 6 horas, a concentração de 100 mg/ml produziu, comparativamente aos demais períodos, estímulo flogístico de menor intensidade. A diluição dessa concentração em 10x determinou a queda da sua potência nos três períodos experimentais testados. Mesmo assim, ainda, permaneceu com potência

superior aos modelos da carragenina 1% e da paracoccidioidina (TABELAS 2 e 3), págs. 99 e 110.

Pela análise do percentual de inibição dos fármacos antiinflamatórios testados, constatamos que os antiinflamatórios não esteróides apresentaram efeito decrescente, enquanto que o antiinflamatório esteróide e o fármaco citostático apresentaram potência crescente no decorrer do experimento, tendo sido mais acentuado no período compreendido entre 1 e 6 horas (TABELA 4), pág. 101

Uma hora após a estimulação flogógena, a indometacina e o tenoxicam apresentaram efeitos antiinflamatórios mais acentuados, comparativamente ao metotrexato e a dexametasona. Nesse período experimental, a indometacina com o percentual de inibição de 52,45% foi o fármaco mais potente, seguido em ordem decrescente de potência pelo tenoxicam, dexametasona e metotrexato, respectivamente, com os percentuais de 45,82%, 27,17% e 8,96% (TABELA 4 e GRÁFICO V), págs. 101 e 110.

Entre uma e três horas, constatamos a discreta queda da potência da indometacina (48,61%), enquanto que a dexametasona teve um sensível aumento do seu efeito inibitório, atingindo em três horas efeito superior (54,54%) ao da indometacina. Nesse período, o tenoxicam apresentou acentuada perda da potência (15,94%). Contudo, o metotrexato (26,84%) apresentou aumento (TABELA 4 e GRÁFICO V).

Com 6 horas, todos os quatro medicamentos testados apresentaram diminuição do efeito antiinflamatório, comparativamente ao período anterior. Desses, a indometacina com o percentual de inibição de 39,98% foi o medicamento mais potente. Já, o tenoxicam proporcionou inibição negativa, -14,17% (TABELA 4 e GRÁFICO V), pág. 101

Com o objetivo de verificar se o efeito antiinflamatório agudo dos medicamentos não esteróides testados, nos modelos experimentais induzidos pela carragenina e da placa microbiana dental, foi dependente da concentração do fármaco, administramos a indometacina nas concentrações de 75 e 100 mg, conforme a tabela 2, pág. 99.

O Teste de Friedman demonstrou diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$), indicando que o aumento da concentração do fármaco de 75 para 100 mg determinou o aumento do percentual da inibição do exsudato inflamatório.

Nesses modelos experimentais, também, verificamos a diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$) entre os períodos de 1 e 6 horas. Tal resultado, indicou que os fármacos antiinflamatórios testados inibiram a exsudação plasmática durante todo o experimento (TABELA 2; GRÁFICOS II; III), págs. 99, 108 e 109.

4.1.3. MODELO EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA PARACOCCIDIOIDINA E SOLUÇÃO SALINA (0.9%)

O modelo induzido pela paracoccidioidina apresentou características semelhantes ao modelo induzido pela placa bacteriana dental, diferindo desse em relação a menor intensidade da estimulação flogógena (TABELA 3). Identificando-se, já no período experimental de 1 hora, efeito antiinflamatório menos acentuado, particularmente, dos inibidores da ciclooxigenase (TABELA 4; GRÁFICOS V e VI), págs. 101 e 110.

Nesse período experimental (1 hora), igualmente, salientou-se o aumento do efeito apresentado pelo metotrexato (34,97%), comparativamente, ao efeito por ele apresentado no modelo da placa microbiana dental, porém semelhante ao da carragenina.

Três horas após a estimulação flogógena, contrariamente ao ocorrido no modelo da PMD, destacou-se o aumento da potência apresentada pelo tenoxicam (45,69%), que foi superior a dos demais fármacos testados. Tal resultado indicou que, na estimulação flogógena induzida pela paracoccidioidina, haja a participação de mecanismos inflamatórios mais acentuadamente bloqueados por esse fármaco, possivelmente, estimulados com menor intensidade no modelo induzido pela placa microbiana dental, conectados à resposta imune.

No período de 6 horas, além da potência mais acentuada apresentada pelo tenoxicam (21,75%) comparativamente ao efeito proporcionado no modelo da placa, a dexametasona (40,60%) teve aumento da potência antiinflamatória. Também verificamos que esses medicamentos apresentaram diferenças quanto ao efeito antiinflamatório, pois a dexametasona apresentou aumento de potência no período compreendido entre 3 e 6 horas, enquanto que o tenoxicam diminuiu o efeito antiinflamatório (GRÁFICOS V, VI).

O efeito antiinflamatório semelhante ao apresentado pela indometacina nos modelos da placa microbiana dental e da paracoccidioidina, bem como o aumento da potência apresentada pelo tenoxicam no modelo da paracoccidioidina, sugeriram que além da inibição da síntese de prostaglandinas, o tenoxicam, também, bloqueie outros mecanismos flogógenos induzidos mais acentuadamente pela paracoccidioidina comparativamente a placa microbiana dental, não inibidos pela indometacina (GRÁFICOS V, VI), tal como o nível de nitrito, reduzindo a produção de ON.

5.1.4. RELAÇÃO ENTRE O EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E PERÍODO EXPERIMENTAL

Dos modelos experimentais testados, apenas no modelo induzido pela carragenina, o percentual de inibição do exsudato inflamatório foi estatisticamente significativo ($P < 0.05$), particularmente, a partir do período de 3 horas. Tal resultado indicou o período em que os fármacos apresentaram maior potência antiinflamatória (GRÁFICO IV), pág. Nos outros dois modelos, o percentual de inibição foi semelhante nos 3 períodos, demonstrada pela diferença estatisticamente não significativa ($P > 0.05\%$) (TABELA 4), pág. 101.

A análise do efeito antiinflamatório, também, possibilitou-nos verificar que a indometacina, apresentou nos modelos inflamatórios induzidos pela placa microbiana dental (PMD) e paracoccidioidina (PCD), potência decrescente com o decorrer do tempo, constatando-se maior intensidade do seu efeito em 1 hora. No modelo inflamatório induzido pela carragenina a potência foi inicialmente crescente, atingindo efeito máximo em 3 horas e decrescendo no período de 6 horas (GRÁFICOS IV, V, VI), pags. 109 e 110.

O tenoxicam, no modelo inflamatório induzido pela placa microbiana dental, apresentou potência máxima em 1 hora, a partir daí, o seu efeito antiinflamatório apresentou intensidade decrescente (GRÁFICO V), pág. Nos modelos induzidos pela carragenina e paracoccidioidina, o efeito foi crescente até o período de 3 horas, quando atingiu o pico, decrescendo acentuadamente até 6 horas. O decréscimo foi mais acentuado no modelo induzido pela carragenina (GRÁFICOS IV, VI).

Nos modelos induzidos pela carragenina, placa microbiana dental e paracoccidioidina, o efeito apresentado pela dexametasona foi crescente até 3 horas, atingindo o pico neste período. Decresceu, às 6 horas, nos modelos da PMD e CG (gráfico IV, V). Entretanto, no modelo inflamatório induzido pela paracoccidioidina (PCD) apresentou efeito crescente, atingindo o pico às 6 horas (GRÁFICO VI).

A inibição determinada pelo metotrexato ao edema inflamatório gerado pela placa microbiana dental e carragenina foi semelhante, ou seja, crescente até 3 horas e decrescente a partir daí, diferindo apenas em relação à intensidade do efeito inibitório, que, no modelo da carragenina, foi mais acentuado (GRÁFICOS IV e V). Já, em relação ao modelo da paracoccidioidina, apresentou efeito decrescente a partir de 1 hora (GRÁFICO VI), atingindo o pico nesse período experimental.

5.1.5. RELAÇÃO ENTRE O EXTRAVASAMENTO PROTÉICO E O MODELO EXPERIMENTAL

Os modelos experimentais induzidos pela placa microbiana dental e paracoccidioidina ao serem submetidos ao teste de Friedmann, apresentaram-se estatisticamente significativos ($P < 0.05$), em relação ao extravasamento protéico.

Evidenciamos pelo teste das comparações múltiplas, respectivamente, no período compreendido entre 1 e 6 horas e 1 e 3 horas diferença significativa entre esses períodos, indicando que o extravasamento protéico induzido pela PMD foi crescente

acentuado após 3 horas, decrescendo após esse período experimental (TABELA 3), teste Friedman não significativo ($P > 0.05$).

No modelo induzido pela suspensão de carragenina e solução de Hanks, o extravasamento protéico foi semelhante durante todo o experimento, conforme indicou o teste Friedman não significativo ($P > 0.05$).

5.1.6. RELAÇÃO ENTRE O MECANISMO ANTIINFLAMATÓRIO AGUDO E O MODELO EXPERIMENTAL

Por meio da análise do efeito dos medicamentos antiinflamatórios, verificamos que os inibidores do metabolismo do ácido araquidônico via inibição da fosfolipase A_2 por impedirem a ativação da ciclooxigenase (indometacina e tenoxicam) e da lipooxigenase (dexametasona), no período experimental de 1 hora, nos modelos inflamatórios induzidos pela placa microbiana dental e da paracoccidiodina apresentaram comparativamente ao modelo da carragenina potência antiinflamatória mais acentuada, indicando a participação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico, no aumento da permeabilidade vascular e do extravasamento protéico, já no período experimental de 1 hora (TABELA 4; GRÁFICOS V; VI), pág. 100 e 110.

Nesse período (1 hora), o efeito antiinflamatório apresentado pelo metotrexato por ter sido mais acentuado, nos modelos experimentais induzidos pela carragenina e paracoccidiodina, comparativamente ao modelo da placa microbiana dental indicou, nos dois primeiros modelos, o menor estímulo à produção dos metabólitos derivados do ácido araquidônico, bem como a maior participação dos produtos resultantes da ativação dos sistemas das cininas, fibrinolítico, da coagulação e do complemento (TABELA 4; GRÁFICOS IV, V, VI), pág. 100, 109 e 110.

Por sua vez, o efeito antiinflamatório apresentado pelos quatro medicamentos nos modelos induzidos pela CG, PMD, PCD sugere que nesses modelos haja a participação tanto dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico quanto de outros mediadores químicos, cujos mecanismos estão relacionados.

Após o período experimental de 3 horas, no modelo da placa, todos os fármacos diminuíram de potência, como tenoxicam e indometacina, enquanto que no modelo da paracoccidiodina a potência antiinflamatória da dexametasona e do metotrexato aumentou. Tais resultados sugerem que após esse período experimental haja a diminuição da síntese e secreção das prostaglandinas, bem como o aumento da produção dos leucotrienos e de outros fatores quimiotáticos para neutrófilos bloqueados mais acentuadamente bloqueados pelo metotrexato e dexametasona no modelo da paracoccidiodina (GRÁFICOS V; VI), comparativamente ao da placa microbiana dental.

5.2. EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO CRÔNICO

5.2.1 TESTE DA INDUÇÃO DOS GRANULOMAS EXPERIMENTAIS

5.2.1.1. MACROSCOPIA

A evolução das lesões induzidas pela inoculação da placa microbiana dental, em ratos da espécie *Mus norvegicus albinus*, variaram de animal para animal. Geralmente, observamos no local, imediatamente após a inoculação, a presença de pápulas entematosas circunferenciais, que persistiram por aproximadamente 1 dia.

No final do primeiro dia, essas lesões adquiriram o aspecto nodular bem delimitado, fixas aos tecidos circunjacentes, de forma ovóide, consistência mole, medindo aproximadamente 2,5 cm, que, em alguns animais, eram recobertas por cútis de aparência normal e ulcerada em outros. As lesões aumentaram progressivamente até o final da primeira semana.

A partir daí, diminuíram consideravelmente, adquirindo no final da terceira semana a consistência firme, quando então, apresentaram-se móveis a palpação. Algumas dessas lesões se tornaram multinodulares, enquanto outras sofreram resolução. Em algumas situações apenas visualizamos a presença da substância oleosa usada como veículo, circundada por uma tênue cápsula de tecido de consistência frouxa e de cor rósea.

5.2.1.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

5.2.1.2.1. GRUPO CONTROLE AOS 7 DIAS

O exame microscópico do material removido após 7 dias da inoculação da suspensão da placa microbiana dental revelou a presença de uma área central de necrose supurativa. Nessa região, observamos a presença de uma massa de células necróticas, que de permeio apresentaram um material eosinófilo granular de aparência fibrinóide, contendo no seu interior estruturas basófilas de diferentes tamanhos, compatíveis com os fragmentos da placa microbiana dental inoculada. Circundando a região central, visualizamos a presença de um acentuado número de polimorfonucleares neutrófilos, apresentando núcleos íntegros e em destruição (piócitos), assim como um número mínimo e esparsos de macrófagos, células pseudoxantomatosas e linfócitos.

Circundando a região supurativa central, foi observada a presença de uma cápsula de tecido de granulação, constituída por feixes delgados de fibras colágenas, separadas por um material eosinofílico fibrinóide e edematoso. Os fibroblastos com

núcleos fusiformes e os angioblastos foram os elementos celulares mais frequentemente observados. Os macrófagos em número reduzido apresentaram-se com diferentes tamanhos e formas. Seus núcleos eram redondos, ovóides, fusiformes, riniformes e o seu citoplasma continha material fagocitado. Em muitos campos, essas células, assemelhavam-se aos fibroblastos, às células endoteliais e ao linfócito, diferindo desse pela basofilia nuclear menos intensa e por apresentar os nucléolos bem evidentes. Os neutrófilos em número moderado; escassos linfócitos; pequenos brotos capilares e vasos sangüíneos de pequeno calibre, em número acentuado, contendo no seu interior hemácias e leucócitos predominantemente do tipo polimorfonuclear, também, foram visualizados.

4.2.1.2.2. GRUPO CONTROLE AOS 14 DIAS

Aos 14 dias, a área central de necrose supurativa ainda persistia com características microscópicas semelhantes às constatadas no período experimental de 7 dias, constituindo-se, predominantemente, por neutrófilos, ora íntegros ora apresentando-se com os núcleos fragmentados. Constatamos, igualmente, no interior da zona de necrose e nas proximidades do tecido granulomatoso, a presença de macrófagos, células pseudoxantomatosas, células gigantes multinucleadas, e linfócitos em maior número do que o observado no período experimental anterior.

O tecido granulomatoso apresentou-se mais exuberante e menos edematoso do que o observado no período inicial, constituindo-se por feixes mais espessos de fibras colágenas separadas por fibroblastos com núcleos fusiformes. O número dos neutrófilos presentes nesse tecido reduziu em relação ao período anterior. Entretanto, o número de macrófagos, linfócitos, bem como o de plasmócitos aumentou. Os macrófagos apresentando núcleos redondos, fusiformes, ovóides e riniformes, excêntricos e basófilos, com os nucléolos bem evidentes e citoplasma vacuolado ou contendo material fagocitado, que de vez em quando formavam células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e do tipo corpo estranho foram as células mais observadas. Os brotos capilares, e os vasos sangüíneos apresentando no seu lúmen leucócitos mononucleares foram observados em todo o tecido granulomatoso. Contudo, o número desses brotos diminuiu acentuadamente em relação ao período anterior, não obstante, o calibre vascular ter aumentado do centro para a periferia do granuloma. Em determinadas regiões esse tecido formava dobras e vilosidades, constituídas por tecido conjuntivo contendo várias camadas de macrófagos, predominantemente com as formas arredondada e fusiforme, linfócitos e vasos sangüíneos, que penetravam em direção ao material de aparência fibrinóide se acumulando na região central do granuloma.

4.2.1.2.3. GRUPO CONTROLE 21 DIAS

Com 21 dias a área central de necrose supurativa diminuiu consideravelmente em relação aos períodos experimentais de 7 e 14 dias, observando-se, ainda, a presença de restos celulares, bem como a maior quantidade de tecido granulomatoso em substituição à área de necrose supurativa. Em comparação aos períodos experimentais anteriores, ocorreu a diminuição do número dos polimorfonucleares neutrófilos, aumentando concomitantemente o material eosinófilo granular, e o número de macrófagos, células pseudoxantomatosas, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e do tipo corpo estranho, que, aparentemente, apresentaram-se com o número maior de núcleos. Linfócitos e plasmócitos também foram observados em trânsito por essa área. O aumento do seu número e a diminuição do número dos vasos sanguíneos no interior do tecido granulomatoso, conjuntamente com o aumento da quantidade de fibras colágenas e dos vasos sanguíneos, particularmente, na região periférica do granuloma, representaram as principais alterações do período.

4.2.1.2.4. GRUPO CONTROLE AOS 28 DIAS

Neste período experimental a região central de necrose se apresentou menor, comparativamente aos períodos anteriores; sendo constituída por restos de células necróticas, macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos e plasmócitos. Os neutrófilos em número mínimo, igualmente, foram observados em trânsito por essa área. Ainda, constatamos aumento na quantidade do tecido granulomatoso, que penetrava por entre o material granular eosinófilo abundante nessa região. O quadro predominante foi a exuberância do tecido granulomatoso caracterizada pelo maior número de macrófagos do que o observado aos 21 dias, e pelo aumento, especialmente, na periferia do granuloma, da vascularização e da síntese de colágeno. De permeio, verificamos o aumento do número de policariontes de macrófagos (células gigantes), contendo no seu citoplasma estruturas basófilas ou vacuoladas, ora dispersas, ora formando com as demais estruturas arranjos nodulares.

4.2.1.2.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Nos grupos experimentais medicados com antiinflamatórios não esteróides (indometacina e tenoxicam), esteróides (dexametasona) e citostática (metotrexato), aos 7 dias, a área central de necrose supurativa se apresentou, aparentemente, com as mesmas características histopatológicas observadas no grupo controle, porém, apresentando um número menor de polimorfonucleares neutrófilos. Aos 14 dias, a presença predominante, ainda, era dessas células. Os macrófagos e os linfócitos, também, foram visualizados em maior número do que o observado nos grupos controle e experimentais do período anterior. Com 21 dias, o número de neutrófilos, macrófagos, células pseudoxantomatosas, células gigantes multinucleadas, linfócitos e plasmócitos, presentes nesta área, reduziu sensivelmente. Contudo, ocorreu aumento do conteúdo do

material granular eosinofílico de aparência fibrinóide, que, aos 28 dias, abrangia a quase totalidade da região central do granuloma.

O tecido o granulomatoso, aos 7 dias, constituiu-se predominantemente por fibroblastos e angioblastos, comparativamente aos macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, que se apresentavam em número mínimo. Também foi observada, em relação ao grupo controle, com exceção do grupo medicado com indometacina, o aumento da proliferação angioblástica e da vascularização.

Decorridos 14 dias, constatamos, em relação ao grupo controle, a redução dos componentes celulares e vasculares do tecido granulomatoso, que, nesses grupos, circundava e se projetava em direção à área central. Todavia, aparentemente, alguns dos seus componentes, tal como as fibras colágenas, aumentaram.

Aos 21 dias, além da redução do número de macrófagos e do aparente aumento, em relação ao período anterior, da vascularização do tecido granulomatoso, que, com exceção do grupo medicado com o metotrexato se apresentou semelhante ao controle, nos demais grupos, constatamos a diminuição da vascularização, comparativamente a esse grupo. Nesse período experimental, salientou-se, também, na síntese do colágeno, o efeito contrário apresentado pelos antiinflamatórios esteróides (dexametasona) e não esteróides (indometacina e tenoxicam), visto que o primeiro a inibiu, enquanto os últimos estimularam.

Com 28 dias, foi observado em todos os grupos a diminuição dos macrófagos, bem como da vascularização, particularmente, no grupo medicado com o tenoxicam. Já em relação às fibras colágenas, constatamos para os grupos medicados com antiinflamatórios esteróides e não esteróides, efeito contrário ao apresentado aos 21 dias. As células gigantes multinucleadas, igualmente, apresentaram-se aparentemente diminuídas em número e com o menor número de núcleos.

5.2.1.3. EFEITO DOS MEDICAMENTOS ANTIINFLAMATÓRIOS NO PESO DOS GRANULOMAS

Pela análise da tabela 5, constatamos que o fármaco com o maior percentual de inibição do peso dos granulomas até o período de 21 dias foi a dexametasona, seguido em ordem decrescente de potência pelo metotrexato, indometacina e tenoxicam (GRÁFICOS VIII, X, XII), págs 111, 112 e 113..

O tratamento estatístico dos resultados constantes nessa tabela na qual analisamos o efeito desses medicamentos em função do tempo, possibilitou-nos verificar que no período compreendido entre 7 e 28 dias, eles influenciaram tanto o peso úmido como o peso seco dos granulomas, reduzindo-os mais acentuadamente no período

como o peso seco dos granulomas, reduzindo-os mais acentuadamente no período compreendido entre 7 e 21 dias. Após esse período, particularmente, no grupo medicado com dexametasona, foi constatado o aumento de ambos os pesos (GRÁFICOS VII, IX e XI).

Quando analisamos individualmente o efeito desses fármacos, verificamos que a dexametasona, no período compreendido entre 7 e 21 dias, reduziu os pesos úmido, seco e diferencial. Após esse período o fármaco inibiu negativamente esses pesos (GRÁFICOS VIII, X, XII).

O metotrexato durante todo experimento inibiu os pesos úmido, seco e diferencial. O maior efeito inibitório dos pesos úmido e seco ocorreu entre 7 e 21 dias. Contudo, no período compreendido entre 21 e 28 dias, constatamos um discreto decréscimo desses pesos. Quanto ao peso diferencial, verificamos durante todo o experimento a inibição desse peso, que se tornou mais acentuada após os 21 dias (GRÁFICO VIII; X; XII).

A indometacina no período compreendido entre 7 e 28 dias reduziu os pesos úmido, seco e diferencial dos granulomas (GRÁFICOS VII, IX, XI). Em relação à diminuição do peso úmido e diferencial agiu mais acentuadamente entre 7 e 14 dias e após 21 dias, decrescendo entre 14 e 21 dias (GRÁFICO VIII, XII). A inibição do peso seco foi semelhante durante todo o experimento (GRÁFICO X).

Entre 7 e 14 dias o tenoxicam reduziu discretamente os pesos úmido, seco e diferencial dos granulomas (GRÁFICOS IX, XII). Após esse último período experimental (14 dias), até 21 dias, foi constatado em relação a inibição desses pesos discreto aumento do seu efeito. Contudo, entre 21 e 28 dias, constatamos a diminuição do efeito inibitório relativamente aos pesos úmido e seco. Quanto ao peso diferencial, apresentou aumento do percentual de inibição que foi crescente até o período de 28 dias (GRÁFICO XII).

3.3. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA VOLUMÉTRICA RELATIVA OCUPADA PELOS MACRÓFAGOS (NM/F), FIBRAS COLÁGENAS (FC), TECIDO GRANULOMATOSO (TG) E REGIÃO CENTRAL DE NECROSE (RC) DOS GRANULOMAS.

3.3.1. DENSIDADE DE VOLUME EM FUNÇÃO DO TEMPO

Com base nos dados constantes nas tabelas 6 e 8, gráficos XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII constatamos que:

3.3.1.1. GRUPO CONTROLE

Nos diferentes períodos experimentais, a diferença estatística em relação à densidade de volume ocupado pelo tecido granulomatoso no granuloma foi considerada não significativa ($P>0,05$) (TABELA 8), pág. 106 e 107

A densidade de volume dos macrófagos (NMF), com exceção do período compreendido entre 7 e 14 dias, apresentou diferença significativa ($P<0,05$). Após esse período de tempo houve o aumento da densidade de volume por eles ocupada, especialmente, no período após 14 dias (TABELAS 6 e 8; GRÁFICO XIV), pág. 101 e 114.

Em relação à densidade de volume ocupada pelas fibras colágenas, verificou-se o seu aumento no período de 7 a 14 dias (GRÁFICO XIII), decrescendo, logo a seguir, até o período de 21 dias, quando, novamente voltou a aumentar, atingindo a densidade máxima em 28 dias (TABELAS 6 e 8; GRÁFICO XII), pág. 103, 113.

A densidade de volume da região central do granuloma, no período compreendido entre 7 e 28 dias, diminuiu lentamente, conforme pode ser comprovada pela diferença estatisticamente significativa entre esses períodos ($P<0,05$) (GRÁFICO XVI; TABELAS 6 e 8), 103, 106, 107 e 115.

5.3.1.2. GRUPO TENOXICAM

O tecido granulomatoso, entre 7 e 21 dias, apresentou a diminuição da densidade de volume, constatando-se o contrário em relação à região central do granuloma ($P<0,05$) (TABELA 8; GRÁFICOS XV; XVI, XXII), pág. 106, 115, 118.

No período compreendido entre 7 e 28 dias ocorreu aumento da densidade de macrófagos (NMF), verificando-se o maior aumento no período compreendido entre 14 e 28 dias ($P<0,05$) (GRÁFICO XIV; TABELAS 8).

Em relação à densidade de volume das fibras colágenas foi observado, que até o período de 21 dias, ocorreu aumento da densidade ocupada por essas fibras, tendo sido aumentada mais acentuadamente no período compreendido entre 14 e 21 dias (GRÁFICO XIII; TABELA 8, GRÁFICO XXIII).

5.3.1.3. GRUPO INDOMETACINA

No período compreendido entre 14 e 28 dias, constatamos o aumento da densidade de volume do tecido granulomatoso e a diminuição da densidade do volume da região central, ($P<0,05\%$) (GRÁFICOS XV; XVI; XXI TABELAS 8). Nesse período

experimental foi observado o aumento da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (GRÁFICO XIV), pág. 114.

O efeito desse medicamento, em relação à densidade das fibras colágenas, foi semelhante ao do tenoxicam (GRÁFICO XIII; XXIII TABELA 8), págs. 106, 107, 113 e 119.

5.3.1.4. GRUPO DEXAMETASONA

No período entre 7 e 21 dias, constatamos a diminuição do tecido granulomatoso (GRÁFICO XV), bem como o aumento da densidade de volume da região central ($P < 0,05$) (GRÁFICO XIII; XXII). Sendo, que, após 21 dias, a densidade de volume do tecido granulomatoso aumentou ($P < 0,05\%$) (GRÁFICO XV, XVI).

A densidade de volume de macrófagos (NM/F), durante o período experimental de 7 a 28 dias aumentou ($P < 0,05$) (GRÁFICO XIII, XIV; TABELA 8).

Até 14 dias o fármaco estimulou a formação das fibras colágenas. Entre 14 e 21 dias identificamos a diminuição da sua densidade volume. Após esse período, verificou-se o aumento da densidade do volume dessas fibras (GRÁFICO XIII; XXIII TABELA 8).

5.3.1.5. GRUPO METOTREXATO

Tanto o tecido granulomatoso quanto à região central de necrose não apresentaram diferença significativa com o decorrer do tempo ($P > 0,05$) (GRÁFICO XV, XVI; XXII; TABELA 8).

A densidade de volume dos macrófagos (NM/F) aumentou durante todo o experimento, destacando-se o período compreendido entre 14 e 28 dias como o de maior densidade ($P < 0,05$) (GRÁFICO XIV; TABELA 8).

No transcorrer de todo o período experimental, constatamos o aumento da densidade de volume das fibras colágenas (GRÁFICO XIII; XXIII TABELA 8).

5.3.2. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO COMPARATIVO DA DENSIDADE DE VOLUME RELATIVA

Com base nos dados constantes nas tabelas 6 e 7, págs. 103, 104 e 105 podemos verificar:

5.3.2.1. PERÍODO EXPERIMENTAL DE 7 DIAS

5.3.2.1.1. GRUPOS CONTROLE E TENOXICAM

No grupo medicado, a densidade de volume da região central, assim como de macrófagos (NM/F) se apresentou menor, com diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle (GRÁFICOS XIV, XVI; XX TABELA 6, 7), págs. 103, 104, 105, 114, 115 e 117.

5.3.2.1.2. GRUPOS CONTROLE E INDOMETACINA

A indometacina produziu a diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (GRÁFICO XIV; TABELAS 6, 7), págs. 103, 104, 105 e 114.

5.3.2.1.3. GRUPOS CONTROLE E DEXAMETASONA

No grupo medicado, constatamos a diminuição da densidade de volume de macrófagos (NM/F) e da região central de necrose supurativa, bem como o aumento do tecido granulomatoso ($P < 0,05\%$) (TABELAS 6; 7; GRÁFICOS XIV, XVI, XV; XX), págs. 103, 104, 105, 114, 115 e 117.

5.3.2.1.4. GRUPOS CONTROLE E METOTREXATO

O metotrexato produziu a diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) para o grupo controle (GRÁFICOS XIV).

5.3.2.1.5. GRUPOS TENOXICAM E INDOMETACINA

O tenoxicam produziu a diminuição da densidade do volume da região central, comparativamente, a da indometacina. Essa diferença foi considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05\%$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVI, XX;), 103, 104, 115 e 117.

5.3.2.1.6. GRUPOS TENOXICAM E DEXAMETASONA

A diferença da densidade do volume do tecido granulomatoso, da região central de necrose supurativa, dos macrófagos (NM/F) e das fibras colágenas foi considerada

estatisticamente não significativa ($P > 0,05$) (TABELAS 6,7; GRÁFICOS XIII, XIV, XV, XVI; XXI; XXII, págs. 103, 104, 105, 113, 114, 115 e 118).

13.2.1.7. GRUPOS TENOXICAM E METOTREXATO

O metotrexato inibiu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) com diferença significativa para o grupo medicado com tenoxicam (TABELAS 6, 7; GRÁFICO XIV; XVII, págs. 106, 104, 105, 114, 116).

13.2.1.8. GRUPOS INDOMETACINA E DEXAMETASONA

A indometacina reduziu mais acentuadamente o tecido granulomatoso, produzindo diminuição da densidade de volume ($P < 0,05$) (TABELAS 6,7; GRÁFICOS XIX, XV; XXI).

A dexametasona reduziu mais acentuadamente a região de necrose supurativa, determinando a sua diminuição ($P < 0,05$) (TABELA 6,7; GRÁFICO XVI, XX).

O efeito inibitório da indometacina, em relação à densidade de volume das fibras colágenas, foi inferior ao da dexametasona. Porém, a diferença foi considerada estatisticamente não significativa ($P > 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII, XXIII).

13.2.1.9. GRUPOS INDOMETACINA E METOTREXATO

Apenas a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre esses grupos, visto que ocorreu a sua diminuição, no grupo medicado com metotrexato em relação ao grupo medicado com indometacina (TABELAS 6,7; GRÁFICOS XIV, XVIII).

13.2.1.10. GRUPOS DEXAMETASONA E METOTREXATO

O metotrexato inibiu mais acentuadamente a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (TABELAS 6,7; GRÁFICOS XIV; XVIII).

13.2. PERÍODO EXPERIMENTAL DE 14 DIAS

13.2.1. GRUPO CONTROLE E TENOXICAM

O medicamento reduziu a densidade de volume dos macrófagos ($P < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVIII, XIV), págs. 103, 104, 105, 115 e 116.

5.3.2.2.2. GRUPO CONTROLE E INDOMETACINA

No grupo medicado agiu diminuindo a densidade de volume do tecido granulomatoso, dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (GRÁFICOS XIV, XV, XVIII, XIX), bem como aumentando a densidade da região central do granuloma ($p < 0,05$) (GRÁFICOS XVI, XX, XXII), págs. 115, 117 e 118.

5.3.2.2.3. GRUPO CONTROLE E DEXAMETASONA

No grupo medicado, constatamos a diminuição da densidade de volume do tecido granulomatoso ($P < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX), págs. 115 e 117.

5.3.2.2.4. GRUPO CONTROLE E METOTREXATO

Houve a diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e fibras colágenas no grupo medicado em relação ao controle ($P < 0,05\%$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XII, XVII, XVIII, XIV), págs. 114, 115 e 116.

5.3.2.2.5. GRUPO TENOXICAM E INDOMETACINA

O grupo medicado com a indometacina apresentou diminuição da densidade de volume do tecido granulomatoso, comparativamente ao grupo medicado com o tenoxicam ($p < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICO XV, XIX).

5.3.2.2.6. GRUPO TENOXICAM E DEXAMETASONA

A dexametasona reduziu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo medicado com tenoxicam ($p < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV; XVIII).

5.3.2.2.7. GRUPO TENOXICAM E METOTREXATO

Em relação às estruturas estudadas, com exceção das fibras colágenas que apresentaram no grupo medicado com metotrexato menor densidade, as demais

mostraram diferenças estatisticamente não significativas entre os grupos ($P > 0.05\%$) (TABELA 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII), págs. 103, 104, 105, 114 e 115.

5.3.2.2.8. GRUPO INDOMETACINA E DEXAMETASONA

A diferença encontrada foi considerada estatisticamente não significativa ($P < 0.05$) (TABELA 6, 7); págs. 103, 104 e 105.

5.3.2.2.9. GRUPO INDOMETACINA E METOTREXATO

Entre estes grupos, verificamos diminuição significativa na densidade do volume da região central do granuloma, bem como das fibras colágenas, no grupo medicado com o metotrexato (TABELAS 6 e 7; GRÁFICOS XIII, XX, XXIII). Esse resultado foi considerado estatisticamente significativo ($P < 0.05$), págs. 114, 117 e 119.

5.3.2.2.10. GRUPO DEXAMETASONA E METOTREXATO

A densidade do volume dos macrófagos (GRÁFICOS XIV, XVIII) e da região central do granuloma (GRÁFICOS XVI, XX), no grupo medicado com o metotrexato, apresentou-se menor, comparativamente ao medicado com a dexametasona, tendo sido a diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0.05$), págs. 115 e 117.

5.3.2.3. PERÍODO EXPERIMENTAL DE 21 DIAS

5.3.2.3.1. GRUPO CONTROLE E TENOXICAM

O tenoxicam produziu a diminuição significativa da densidade do volume do tecido granulomatoso e dos macrófagos ($p < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX, XIV, XVIII). págs. 103, 115, 116 e 117.

Produziu aumento da densidade de volume das fibras colágenas e da região central do granuloma ($p < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII, XXIII), págs. 114, 116 e 118.

5.3.2.3.2. GRUPO CONTROLE E INDOMETACINA

A indometacina reduziu a densidade de volume do tecido granulomatoso e dos macrófagos (NM/F) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV, XIX, XV, XVIII), bem como aumentou a

densidade de volume da região central do granuloma e das fibras colágenas ($P < 0,05$) (GRÁFICOS XVI, XX, XIII, XVII; XXIII), págs. 114, 115, 116 e 119.

5.1.2.3.3. GRUPO CONTROLE E DEXAMETASONA

A dexametasona agiu inibindo a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e do tecido granulomatoso (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX, XIV, XVIII); aumentando a densidade de volume da região central ($P < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVI, XX; XXII), págs. 103, 104, 105, 115, 117 e 119.

5.1.2.3.4. GRUPO CONTROLE E METOTREXATO

Verificamos a diminuição significativa da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) (GRÁFICOS XIV, XVIII), bem como o aumento das fibras colágenas no grupo medicado em relação ao controle ($P < 0,05$) (GRÁFICOS XIII, XVII, XXIII), págs. 114, 118 e 119.

5.1.2.3.5. GRUPO TENOXICAM E INDOMETACINA

O tenoxicam diminuiu mais acentuadamente a densidade de volume dos macrófagos ($P < 0,05$) (TABELA 6,7; GRÁFICOS XIV, XVIII).

5.1.2.3.6. GRUPO TENOXICAM E DEXAMETASONA

Os medicamentos, produziram efeitos contrários em relação à densidade do volume das fibras colágenas, pois a dexametasona diminuiu, enquanto que o tenoxicam aumentou (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII; XXIII).

A dexametasona inibiu mais acentuadamente a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) (TABELAS 6 e 7; GRÁFICOS XIV; XVIII).

5.1.2.3.7. GRUPO TENOXICAM E METOTREXATO

O metotrexato, comparativamente ao tenoxicam, produziu a diminuição na densidade de volume da região central do granuloma (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVI, XX), aumentando a densidade de volume do tecido granulomatoso e dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX, XIV, XVIII; XXI), págs. 115, 116, 117 e 118.

53.2.3.8. GRUPO INDOMETACINA E DEXAMETASONA

A dexametasona reduziu mais acentuadamente a densidade do volume dos macrófagos (NMF) ($P < 0.05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV, XVIII), págs. 103, 104, 105, 114 e 116.

A inibição proporcionada pela dexametasona em relação à densidade do volume das fibras colágenas foi superior a produzida pela indometacina ($P < 0.05$) (TABELA 6 e 7; GRÁFICOS XIII, XVII), págs. 103, 104, 105, 113 e 116.

53.2.3.9. GRUPO INDOMETACINA E METOTREXATO

A diferença constatada foi considerada estatisticamente não significativa ($P > 0.05$) (TABELAS 6, 7).

53.2.3.10. GRUPO DEXAMETASONA E METOTREXATO

A dexametasona reduziu mais acentuadamente a densidade de volume do tecido granulomatoso e das fibras colágenas, sendo a diferença para o grupo metotrexato considerada estatisticamente significativa ($P < 0.05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX, XIII, XVII), págs. 114, 115, 116.

53.2.4. PERÍODO EXPERIMENTAL DE 28 DIAS

53.2.4.1. GRUPOS CONTROLE E TENOXICAM

O tenoxicam produziu a diminuição da densidade de volume do tecido granulomatoso, macrófagos (NMF) e fibras colágenas (TABELAS 6 e 7; GRÁFICOS XV, XIX, XIII, XVII, XIV), págs. 115, 114, 116 e 117 bem como aumentou a densidade do volume da região central do granuloma (GRÁFICOS XVI, XX). Essas diferenças em relação ao grupo controle foram consideradas estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

53.2.4.2. GRUPOS CONTROLE E INDOMETACINA

A indometacina reduziu a densidade de volume do tecido granulomatoso, macrófagos (NMF) e das fibras colágenas ($P < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX, XIV, XVII, XIII, XVII), págs. 101, 104, 105, 115, 117 e 116.

53.2.4.3. GRUPOS CONTROLE E DEXAMETASONA

A dexametasona diminuiu a densidade do volume dos macrófagos (NM/F) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV, XVIII) e aumentou a densidade do volume das fibras colágenas ($P<0,05$) (GRÁFICOS XVII, XIII), págs. 103, 104, 105, 116, 114.

5.3.2.4.4. GRUPOS CONTROLE E METOTREXATO

O metotrexato diminuiu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e fibras colágenas (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV, XVIII, XIII, XVII), aumentando a densidade da região central do granuloma ($P<0,05\%$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVI, XX, XXII), págs. 115, 117 e 118.

5.3.2.4.5. GRUPOS TENOXICAM E INDOMETACINA

A indometacina, comparativamente ao tenoxicam, inibiu mais acentuadamente a densidade do volume da região central do granuloma ($P<0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVI, XX).

5.3.2.4.6. GRUPOS TENOXICAM E DEXAMETASONA

O tenoxicam reduziu mais intensidade a densidade de volume do tecido granulomatoso e das fibras colágenas ($P<0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII, XV, XIX), págs. 114, 115, 116 e 117.

A dexametasona, comparativamente ao tenoxicam, diminuiu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e da região central do granuloma ($P<0,05\%$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV, XVIII; XVI, XX).

5.3.2.4.7. GRUPOS TENOXICAM E METOTREXATO

O efeito inibitório produzido pelo tenoxicam, em relação à densidade de volume do tecido granulomatoso e das fibras colágenas foi superior ao proporcionado pelo metotrexato ($P<0,05$) (GRÁFICOS XIII, XVII, XV, XIV).

O metotrexato, comparativamente ao tenoxicam, diminuiu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F), bem como da região central do granuloma ($P<0,05\%$) (GRÁFICOS XI, XV, XIII, XVII).

5.3.2.4.8. GRUPO INDOMETACINA E DEXAMETASONA

A indometacina diminuiu, mais acentuadamente, a densidade do volume das fibras colágenas (TABELA 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII), págs. 103, 104, 105, 114 e 116.

A dexametasona diminuiu, mais acentuadamente, a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVIII, XIV), págs. 116 e 114.

3.2.4.9. GRUPO INDOMETACINA E METOTREXATO

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

3.2.4.10. GRUPO DEXAMETASONA E METOTREXATO

A dexametasona, comparativamente ao metotrexato, diminuiu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) ($P < 0,05$) (TABELAS 6,7; GRÁFICOS XIV, XVIII), págs. 114 e 116.

O metotrexato reduziu, mais acenuadamente, a densidade das fibras colágenas, ($P < 0,05$) (TABELA 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII).

14. ANÁLISE DA INTENSIDADE DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO

Tomando por base os resultados da nossa análise microscópica descritiva, bem como dados apresentados nas tabelas 6 e 7 e nos gráficos XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII e XXIII (págs. , 114, 115, 116, 117, 118), verificamos que:

14.1. TENOXICAM

O tenoxicam, aos 7 dias, agiu diminuindo a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e da região central de necrose supurativa. Porém, estimulou a angiogênese com potência semelhante a da dexametasona. Diminuiu a densidade de volume de macrófagos (NM/F) com potência semelhante a da indometacina e da dexametasona, porém, inferior a do metotrexato. Esse fármaco apresentou em relação à redução da densidade de volume da região central de necrose supurativa potência superior a da indometacina, porém, semelhante a da dexametasona e do metotrexato conforme demonstrou a diferença estatisticamente não significativa entre esses grupos (TABELA 7, pgs. 104 e 105).

Aos 14 dias, reduziu a densidade de volume de macrófagos (NM/F), com efeito semelhante ao da indometacina e ao do metotrexato, porém, superior ao obtido com a dexametasona. Em relação à inibição da densidade de volume das fibras colágenas apresentou efeito inferior ao do metotrexato. Nesse período, ainda, agiu inibindo a vascularização com potência inferior a da indometacina e da dexametasona.

Decorridos 21 dias da estimulação flogógena, agiu inibindo a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e do tecido granulomatoso, bem como aumentando a densidade do volume das fibras colágenas e da região central do granuloma. A diminuição da densidade de volume do tecido granulomatoso foi semelhante à da dexametasona, bem como superior à do metotrexato e à da indometacina. Contudo, cabe salientarmos que a diferença estatística para esse último fármaco foi considerada não significativa ($p > 0.05$) (GRAFICO XIX) Quanto à densidade de volume das fibras colágenas acusou efeito estimulador. Também, inibiu a vascularização com potência superior aos demais fármacos testados.

Aos 28 dias, o tenoxicam produziu a diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F), do tecido granulomatoso e das fibras colágenas, aumentando a densidade de volume da região central de necrose. O efeito inibitório da densidade de volume do tecido granulomatoso proporcionado pelo tenoxicam foi superior ao do metotrexato e da dexametasona, possivelmente, por inibir com maior intensidade a densidade do volume das fibras colágenas comparativamente à dexametasona e ao metotrexato. A potência do tenoxicam em relação à redução da densidade de volume de macrófagos (NM/F) foi inferior à produzida pela dexametasona. Nesse período perdeu parte do efeito inibidor da vascularização, mas, mesmo assim, ainda foi o fármaco que apresentou a maior potência inibitória dessa estrutura.

5.4.2. INDOMETACINA

A indometacina, aos 7 dias, inibiu a densidade do volume de macrófagos (NM/F), com efeito semelhante à do tenoxicam e à da dexametasona, porém, inferior à do metotrexato. Quanto à inibição da vascularização agiu com potência superior aos demais fármacos testados, que apresentaram efeito contrário.

No período experimental de 14 dias, inibiu a densidade do volume do tecido granulomatoso, com potência superior à do tenoxicam, bem como a densidade do volume dos macrófagos (NM/F), com diferença não significativa para os demais fármacos testados. Nesse período experimental, apresentou acentuado efeito redutor da vascularização. Contudo, aumentou a densidade de volume da região central com potência superior à do metotrexato. Em relação à inibição da densidade de volume das fibras colágenas apresentou efeito inferior ao do metotrexato. Já, quanto à inibição da vascularização produziu efeito superior ao dos demais fármacos testados.

Aos 21 dias reduziu a densidade do volume dos macrófagos (NM/F) e do tecido granulomatoso, aumentando a densidade de volume das fibras colágenas e da região central. Reduziu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) com potência inferior aos demais fármacos testados. Quanto à redução densidade de volume do tecido granulomatoso e ao aumento da região central apresentou potência semelhante a dos demais fármacos testados. Em relação à densidade de volume das fibras colágenas acusou efeito estimulador semelhante ao do tenoxicam e ao do metotrexato; ao contrário a dexametasona as inibiu. Todavia, apresentou efeito inibidor da vascularização inferior ao apresentado pelo tenoxicam e pela dexametasona.

Aos 28 dias, reduziu a densidade do volume dos macrófagos (NM/F), fibras colágenas e do tecido granulomatoso. A diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) foi semelhante à do metotrexato e à do tenoxicam e inferior à da dexametasona. Apresentou em relação à diminuição da densidade do volume do tecido granulomatoso potência semelhante à da dexametasona e do metotrexato, bem como inferior à do tenoxicam. Contudo, cabe alertarmos, que a diferença estatística em relação ao efeito apresentado por esse último fármaco foi considerada estatisticamente não significativa (TABELA 7), págs. 104 e 105. Reduziu a densidade de volume das fibras colágenas com potência semelhante a do tenoxicam e do metotrexato, bem como superior à da dexametasona. Inibiu a vascularização com potência semelhante à da dexametasona e metotrexato, porém, inferior à do tenoxicam.

5.4.3. DEXAMETASONA

A dexametasona, aos 7 dias, diminuiu a densidade do volume da região central de necrose, com potência superior ao da indometacina e semelhante à do tenoxicam; reduziu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F), com potência inferior à apresentada pelo metotrexato e semelhante à do tenoxicam e indometacina. Aumentou a densidade de volume do tecido granulomatoso com diferença significativa para a indometacina, possivelmente, por ter estimulado a angiogênese.

Aos 14 dias a dexametasona reduziu a densidade de volume do tecido granulomatoso, com diferença não significativa para os demais medicamentos testados. Apresentou efeito redutor da angiogênese semelhante ao da indometacina e superior ao do tenoxicam e ao do metotrexato.

Com 21 dias, agiu diminuindo a densidade de volume do tecido granulomatoso, com potência superior à do metotrexato e semelhante à da indometacina e à do tenoxicam. Reduziu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F) com potência inferior

à do tenoxicam e superior à da indometacina, bem como diminuiu a vascularização com potência superior à da indometacina e à do metotrexato, bem como inferior à do tenoxicam. Contudo, aumentou a densidade do volume da região central.

Aos 28 dias, diminuiu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F). Contudo, aumentou a densidade do volume das fibras colágenas, enquanto que a indometacina, tenoxicam e metotrexato apresentaram efeito contrário. O efeito inibitório da densidade do volume do macrófagos (NM/F) foi superior ao da indometacina, do metotrexato e do tenoxicam. Apresentou em relação à densidade do volume das fibras colágenas, efeito contrário ao dos demais fármacos testados, pois aumentou a densidade dessas fibras. Também agiu inibindo a vascularização com potência semelhante a da indometacina e a do metotrexato. Todavia, inferior à do tenoxicam.

6.4.4. METOTREXATO

Aos 7 dias reduziu a densidade de volume dos macrófagos (NM/F). A potência apresentada, em relação à densidade de volume de macrófagos (NM/F), foi superior à da indometacina, do tenoxicam e da dexametasona. Nesse período, aparentemente, produziu aumento da angiogênese.

Com 14 dias o fármaco diminuiu a densidade de volume de macrófagos (NM/F) com potência superior à dexametasona, e a densidade de volume das fibras colágenas com potência superior à da indometacina e à do tenoxicam, porém, semelhante à da dexametasona. Contudo, produziu uma discreta diminuição da angiogênese.

Vinte e um dias após a estimulação flogógena, o medicamento reduziu tanto a densidade de volume dos macrófagos (NM/F), com potência semelhante à do tenoxicam e discretamente superior à da indometacina e dexametasona, apesar da diferença apresentado por esses dois últimos fármacos ter se apresentado não significativa ($p > 0.05$). Como apresentou, em relação à densidade de volume das fibras colágenas, efeito contrário ao da dexametasona, aumentando a densidade de volume, com potência semelhante à da indometacina e do tenoxicam. Também, produziu discreta inibição da angiogênese.

Com 28 dias, o fármaco agiu inibindo a angiogênese e diminuindo a densidade de volume de macrófagos (NM/F) e das fibras colágenas, bem como aumentando a densidade de volume da região central. Apresentou o efeito inibitório da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) inferior ao da dexametasona e semelhante ao da indometacina e do tenoxicam. Porém, reduziu a densidade de volume das fibras

colágenas com potência semelhante á da indometacina, inferior á do tenoxicam e superior á da dexametasona, que estimulou a produção dessas fibras.

TABELA 1- Concentração do corante Azul de Evans (em µg) presente no foco inflamatório induzido pela placa microbiana dental em diferentes concentrações.

A G E N T E F L O C Ó G E N O	P E R Í O D O E X P E R I M E N T A L		
	1 H O R A	3 H O R A S	6 H O R A S
PLACA MICROB. DENTAL 500 mg	29,56	101,26	131,58
PLACA MICROB. DENTAL 250 mg	36,58	106,24	131,25
PLACA MICROB. DENTAL 100 mg	33,16	92,53	85,15
PLACA MICROB. DENTAL 10 mg	24,54	36,99	45,38

Aplicado o teste não paramétrico de Friedman, foi considerado significativo ao nível de 5% ($p < 0.05\%$). O teste das comparações múltiplas evidenciou diferença significativa entre os períodos de 1 e 6 horas.

TABELA 2 - Efeito anti-inflamatório agudo da indometacina nas concentrações de 75 mg e 100 mg nos modelos inflamatórios da carragenina e da placa microbiana dental.

G R U P O S	P E R Í O D O E X P E R I M E N T A L		
	1 H O R A A.E. K(%)	3 H O R A S A.E. K(%)	6 H O R A S A.E. K(%)
CONTROLE (CG+SH)	13,24 ---	38,94 ---	28,06 ---
INDOMETACINA 75 mg	14,70 11,02	23,31 40,13	31,02 10,54
INDOMETACINA 100 mg	12,01 9,30	14,00 64,05	22,97 18,14
CONTROLE (PMD+SH)	33,16 ---	92,53 ---	85,15 ---
INDOMETACINA 75 mg	18,37 44,60	62,54 32,41	82,65 2,93
INDOMETACINA 100 mg	15,77 52,44	39,50 57,24	51,11 39,97

LEGENDA: CG- carragenina 1% PBD- placa bacteriana dental 100 mg SH- solução de Hanks A.E.- concentração do azul de Evans no foco inflamatório I- percentual de inibição do exsudato inflamatório corado pelo Azul de Evans SH- Solução de Hanks

Aplicado o teste não paramétrico de Friedman, foi considerado significativo ao nível de 5% ($p < 0.05\%$). O teste das comparações múltiplas evidenciou diferença significativa entre os períodos de 1 e 6 horas.

TABELA 3 - Concentração do corante Azul de Evans (em µg) presente no foco inflamatório induzido por carragenina, placa microbiana dental e paracoccidiodina por período experimental

GRUPOS	PERÍODO EXPERIMENTAL		
	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS
CONTROLE (CG)	13,24	38,94	28,06
INDOMETACINA 100 mg	12,01	14,80	22,97
TENOXICAM 20 mg	13,53	17,81	26,75
METOTREXATO 25 mg	9,04	7,63	14,28
DEXAMETASONA 4 mg	12,57	20,89	17,70
GRUPO	PERÍODO EXPERIMENTAL		
	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS
CONTROLE (PMD)	55,16	92,53	85,15
INDOMETACINA 100 mg	15,77	47,55	51,11
TENOXICAM 20 mg	19,94	73,78	97,22
METOTREXATO 25 mg	30,19	67,69	67,03
DEXAMETASONA 4mg	24,15	41,14	58,04
GRUPO	PERÍODO EXPERIMENTAL		
	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS
CONTROLE (PCD)	16,54	20,92	18,20
INDOMETACINA 100 mg	9,61	12,85	11,63
TENOXICAM 20 mg	10,70	11,36	14,24
METOTREXATO 25 mg	10,82	14,03	13,39
DEXAMETASONA 4 mg	13,40	13,42	10,81

LEGENDA: F- percentual de formação de exsudato inflamatório I- percentual de inibição de exsudato inflamatório CG: Carragenina, PMD: Placa microbiana dental, PCD: Paracoccidiodina

No modelo inflamatório induzido pela carragenina, o teste Friedman foi não significativo ($P > 0,05$). Entretanto, nos modelos experimentais induzidos pela placa microbiana dental e paracoccidiodina esse teste foi considerado significativo ao nível de 5% ($P < 0,05$). Nesses modelos, empregando o teste das comparações múltiplas, constatamos diferenças significativas entre os períodos de 1 a 6 horas e de 1 a 3 horas, respectivamente.

TABELA 4 - Percentual de formação e de inibição do exsudato inflamatório obtido pela indometacina, tenoxicam, dexametazona e metotrexato nos modelos induzidos pela carragenina, placa microbiana dental e paracoccidina.

GRUPOS	PERÍODO EXPERIMENTAL					
	1 HORA F(%) K(%)		3 HORAS F(%) K(%)		6 HORAS F(%) K(%)	
CONTROLE (CG)	100	---	100	---	100	---
INDOMETACINA 100 mg	90,70	9,30	35,95	64,05	81,86	18,14
TENOXICAM 20 mg	102,41	2,41	45,73	54,26	95,33	4,67
METOTREXATO 25 mg	68,27	31,73	19,59	80,41	50,89	49,10
DEXAMETASONA 4 mg	94,93	5,07	53,64	46,35	63,07	36,92
GRUPOS	PERÍODO EXPERIMENTAL					
	1 HORA F(%) K(%)		3 HORAS F(%) K(%)		6 HORAS F(%) K(%)	
CONTROLE (PMD)	100	---	100	---	100	---
INDOMETACINA 100 mg	47,55	52,45	51,38	48,61	60,02	39,98
TENOXICAM 20 mg	54,18	45,82	84,04	15,96	114,17	-14,17
METOTREXATO 25 mg	91,04	8,96	73,15	26,84	78,81	21,29
DEXAMETASONA 4 mg	72,82	27,17	44,46	55,54	68,16	31,83
GRUPOS	PERÍODO EXPERIMENTAL					
	1 HORA F(%) K(%)		3 HORAS F(%) K(%)		6 HORAS F(%) K(%)	
CONTROLE (PCD)	100	---	100	---	100	---
INDOMETACINA 100 mg	57,75	42,24	62,42	37,58	63,90	36,09
TENOXICAM 20 mg	64,30	35,69	54,30	45,69	78,24	21,75
METOTREXATO 25 mg	65,02	34,97	67,06	32,93	73,57	26,42
DEXAMETASONA 4 mg	80,52	19,48	64,14	35,85	59,39	40,60

LEGENDA: F: percentual de formação do exsudato inflamatório; K: percentual de inibição do exsudato inflamatório; CG: Carragenina, PMD: placa microbiana dental, PCD: paracoccidina; SH: Solução de Hank's; SS: Solução salina.

Aplicando o teste de Friedman, foi considerado não significativo ($P > 0,05\%$) nos modelos induzidos pela PMD e PCD, bem como significativo ao nível de 5% ($P < 0,05\%$) para o modelo induzido pela CG. Nesse último modelo, o teste das comparações múltiplas revelou diferença significativa ($P < 0,05\%$) entre os períodos de 1 e 3 horas.

TABELA - 5 Efeito antiinflamatório da Indometacina, tenoxicam, dexametasona e metotrexato no peso úmido seco e diferencial dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental.

PESO DOS GRANULOMAS AOS 7 DIAS					
GRUPOS	PESO ÚMIDO		PESO SECO		PESO DIFERENCIAL
	X	I(%)	X	I(%)	X I(%)
CONTROLE	0,222	0,00	0,048	0,00	0,174 0,00
INDOMETACINA 100 mg	0,141	36,48	0,030	37,5	0,111 36,20
TENOXICAM 20 mg	0,215	3,15	0,043	10,41	0,172 1,15
METOTREXATO 25 mg	0,112	49,54	0,025	47,91	0,087 50,00
DEXAMETASONA 4 mg	0,070	68,46	0,025	47,91	0,045 74,13
PESO DOS GRANULOMAS AOS 14 DIAS					
GRUPOS	PESO ÚMIDO		PESO SECO		PESO DIFERENCIAL
	X	I(%)	X	I(%)	X I(%)
CONTROLE	0,103	0,00	0,028	0,00	0,075 0,00
INDOMETACINA 100 mg	0,053	48,54	0,019	32,14	0,033 56,00
TENOXICAM 20 mg	0,099	3,88	0,027	3,57	0,072 16,00
METOTREXATO 25 mg	0,048	53,39	0,015	46,42	0,030 60,00
DEXAMETASONA 4 mg	0,034	66,99	0,012	57,14	0,023 69,33
PESO DOS GRANULOMAS AOS 21 DIAS					
GRUPOS	PESO ÚMIDO		PESO SECO		PESO DIFERENCIAL
	X	I(%)	X	I(%)	X I(%)
CONTROLE	0,042	0,00	0,016	0,00	0,023 0,00
INDOMETACINA 100 mg	0,032	23,80	0,010	37,50	0,022 15,38
TENOXICAM 20 mg	0,031	26,19	0,010	37,50	0,021 19,63
METOTREXATO 25 mg	0,017	59,52	0,006	62,50	0,011 52,17
DEXAMETASONA 4 mg	0,014	66,66	0,007	56,20	0,007 79,07
PESO DOS GRANULOMAS AOS 28 DIAS					
GRUPOS	PESO ÚMIDO		PESO SECO		PESO DIFERENCIAL
	X	I(%)	X	I(%)	X I(%)
CONTROLE	0,013	0,00	0,005	0,00	0,008 0,00
INDOMETACINA 100 mg	0,006	53,84	0,003	40,00	0,003 62,50
TENOXICAM 20 mg	0,011	15,38	0,005	0,00	0,006 25,00
METOTREXATO 25 mg	0,007	46,15	0,004	20,00	0,003 62,50
DEXAMETASONA 4 mg	0,023	-76,92	0,010	-100,00	0,013 -62,50

LEGENDA: I- Percentual de inibição dos pesos úmido, seco e diferencial X- Média aritmética em g. dos pesos úmido, seco e diferencial

Aplicado o teste não paramétrico de Friedman, constatou-se diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ($p < 0.05$) na média aritmética dos pesos seco, úmido e diferencial dos granulomas. Nos períodos de 7 a 21 dias, o teste das comparações múltiplas evidenciou diferença significativa ($p < 0.05$) entre o peso úmido e seco. Após 21 dias, o Teste de Friedman foi não significativo ($p > 0.05$). Esses mesmos testes foram aplicados em relação ao percentuais de inibição dos referidos pesos, constatando-se diferenças significativas nos períodos de 14 e 28 dias, respectivamente, entre os pesos úmido e seco.

TABELA 6 - Avaliação morfométrica da densidade de volume (Vvi) ocupado pelo tecido granulomatoso, macrófagos, fibras colágenas e região central dos granulomas por grupo e período experimental

DENSIDADE DE VOLUME (Vvi) OCUPADO PELAS FIBRAS COLÁGENAS NO GRANULOMA				
PERÍODO EXPERIMENTAL				
GRUPOS	7 DIAS Vv(G) Vv(TG)	14 DIAS Vv(G) Vv(TG)	21 DIAS Vv(G) Vv(TG)	28 DIAS Vv(G) Vv(TG)
CONTROLE	3,74 7,13	11,09 17,26	7,40 10,73	17,16 20,59
TIPOXICAM*	3,58 5,13	11,75 22,33	11,30 31,87	8,21 18,67
INDOMETACINA*	3,54 7,23	12,23 13,11	11,84 20,59	10,46 17,43
DEXAMETASONA*	3,65 5,16	9,98 18,76	5,41 14,97	22,00 31,16
METOTREXATO*	3,96 6,69	6,56 11,44	10,56 17,60	12,26 18,12
DENSIDADES DE VOLUME (Vvi) OCUPADO PELOS MACRÓFAGOS/CEL SEMELHANTES NO GRANULOMA				
PERÍODO EXPERIMENTAL				
GRUPOS	7 DIAS Vv(G) Vv(TG)	14 DIAS Vv(G) Vv(TG)	21 DIAS Vv(G) Vv(TG)	28 DIAS Vv(G) Vv(TG)
CONTROLE	3,69 7,03	5,18 8,1	14,2 20,55	9,37 11,24
TIPOXICAM*	3,41 4,88	4,39 8,4	4,2 11,93	7,56 16,95
INDOMETACINA*	2,72 5,55	4,29 13,3	6,3 11,93	8,17 12,59
DEXAMETASONA*	2,90 4,10	5,04 8,5	5,35 14,81	5,60 8,31
METOTREXATO*	1,92 3,25	4,07 7,3	4,32 7,21	7,35 10,92
DENSIDADE DE VOLUME (Vvi) E O VOLUME (em μm^3) OCUPADO PELO TECIDO GRANULOMATOSO				
PERÍODO EXPERIMENTAL				
GRUPOS	7 DIAS Vv(%) V(μm^3)	14 DIAS Vv(%) V(μm^3)	21 DIAS Vv(%) V(μm^3)	28 DIAS Vv(%) V(μm^3)
CONTROLE	52,45 105092856	64,25 129294792	69,90 128562984	83,36 146858184
TIPOXICAM*	69,95 125295984	52,60 93174840	35,47 70933104	44,00 76290984
INDOMETACINA*	49,08 91815768	34,18 61759368	57,53 106974648	64,94 100858824
DEXAMETASONA*	70,74 140690088	38,01 68116416	36,92 67195656	67,48 118840393
METOTREXATO*	59,22 112384800	57,91 97539552	59,98 111182544	67,64 117664272
DENSIDADE DE VOLUME (Vvi) E O VOLUME (em μm^3) DA REGIÃO CENTRAL DO GRANULOMA				
PERÍODO EXPERIMENTAL				
GRUPOS	7 DIAS Vv(%) V(μm^3)	14 DIAS Vv(%) V(μm^3)	21 DIAS Vv(%) V(μm^3)	28 DIAS Vv(%) V(μm^3)
CONTROLE	47,55 95291856	35,75 71874400	30,01 57734424	15,20 29298456
TIPOXICAM*	30,05 53814024	47,39 83896560	64,53 129033432	55,99 97069104
INDOMETACINA*	50,52 95239584	65,82 118918300	42,47 78956856	35,06 54441288
DEXAMETASONA*	29,28 58178736	61,39 111051864	63,88 118788120	32,51 57263973
METOTREXATO*	40,78 77362560	42,09 70880832	40,02 74173968	32,36 56270808

LEGENDA: Vv(G)=densidade de volume da estrutura no granuloma Vv(TG)=densidade de volume da estrutura no tecido granulomatoso V=volume total da estrutura nos cortes histológicos examinados * = dose máxima diária dos fármacos T=20 mg, I=100 mg, D=4 mg, M=25 mg.

OBSERVAÇÃO: na presente tabela encontram-se sintetizados os dados obtidos em 30 repetições (campos microscópicos) para cada estrutura analisada, cujos resultados de tratamento estatístico é apresentado nas tabelas 7 e 8.

TABELA 7 - Testes de Friedmann e das Comparações Múltiplas objetivando constatar diferença significativa entre os grupos em relação ao efeito antiinflamatório por período experimental

PERÍODO EXPERIMENTAL DE 7 DIAS

TESTE ESTAT.	NM/F	FC	TG	RC
FREDMAN	$X^2_f = 44.453^*$	$X^2_f = 0.313^{ns}$	$X^2_f = 27.598^*$	$X^2_f = -146.643^*$
D.M.S.	43,20			
Comp. Múlt.				
Cont. - Ten.	45,0 (p<0.05) *	não aplicado	26,0 (p>0.05) ^{ns}	56,5 (p<0.05) *
cont. - Ind.	75,50 (p<0.05) *	não aplicado	15,00 (p>0.05) ^{ns}	0,5 (p>0.05) ^{ns}
Cont. - Dex.	46,5 (p<0.05) *	não aplicado	55,5 (p<0.05) *	70,0 (p<0.05) *
Cont. - Met.	126,5 (p<0.05) *	não aplicado	18,0 (p>0.05) ^{ns}	34,0 (p>0.05) ^{ns}
Ten. - Ind.	30,5 (p>0.05) ^{ns}	não aplicado	41,0 (p>0.05) ^{ns}	47,0 (p<0.05) *
Ten. - dex.	1,5 (p>0.05) ^{ns}	não aplicado	29,5 (p>0.05) ^{ns}	13,5 (p>0.05) ^{ns}
Ten. - Met.	81,5 (p<0.05) *	não aplicado	8,0 (p>0.05) ^{ns}	22,5 (p>0.05) ^{ns}
Ind. - Dex.	29,0 (p>0.05) ^{ns}	não aplicado	70,5 (p<0.05) *	60,5 (p<0.05) *
Ind. - Met.	51,0 (p<0.05) *	não aplicado	33,0 (p>0.05) ^{ns}	24,5 (p>0.05) ^{ns}
Dex. - Met.	80,0 (p<0.05) *	não aplicado	37,5 (p>0.05) ^{ns}	36,0 (p>0.05) ^{ns}

PERÍODO EXPERIMENTAL DE 14 DIAS

TESTE ESTATÍST.	NM/F	FC	TG	RC
TESTE F	---	7,756 *	---	---
FRIEDMAN	$X^2 = 27.298^*$	---	$X^2 = 18.510^*$	$X^2 = 11.186^*$
d.m.s. 5%	43,20	3,04 e 3,20 *	43,20	43,20
GRUPOS	Comp. múlt.	Tukey	Comp. Múlt.	Comp. Múlt.
Cont. - Ten.	84,0 (p<0,05) *	0,95 (p>0,05) ^{ns}	22,50 (p>0,05) ^{ns}	11,5 (p>0,05) ^{ns}
Cont. - Ind.	71,5 (p<0,05) *	0,03 (p>0,05) ^{ns}	78,50 (p<0,05) *	47,5 (p<0,05) *
Cont. - Dex.	35,5 (p>0,05) ^{ns}	1,83 (p>0,05) ^{ns}	56,50 (p<0,05) *	42,5 (p>0,05) ^{ns}
Cont. - Met.	86,0 (p<0,05) *	5,24 (p<0,05) *	36,50 (p>0,05) ^{ns}	4,5 (p>0,05) ^{ns}
Ten. - Ind.	12,5 (p>0,05) ^{ns}	0,98 (p>0,05) ^{ns}	56,0 (p<0,05) *	36,0 (p>0,05) ^{ns}
Ten. - Dex.	48,5 (p<0,05) *	0,88 (p>0,05) ^{ns}	34,0 (p>0,05) ^{ns}	31,0 (p>0,05) ^{ns}
Ten. - Met.	2,0 (p>0,05) ^{ns}	4,66 (p>0,05) *	14,0 (p>0,05) ^{ns}	16,0 (p>0,05) ^{ns}
Ind. - Dex.	36,0 (p>0,05) ^{ns}	1,26 (p>0,05) ^{ns}	22,0 (p>0,05) ^{ns}	5,0 (p>0,05) ^{ns}
Ind. - Met.	14,5 (p>0,05) ^{ns}	5,22 (p>0,05) *	42,0 (p>0,05) ^{ns}	52,0 (p<0,05) *
Dex. - Met.	50,5 (p<0,05) *	3,96 (p>0,05) ^{ns}	20,0 (p>0,05) ^{ns}	47,0 (p<0,05) *

CONTINUAÇÃO

PERÍODO EXPERIMENTAL DE 21 DIAS

TESTE ESTAT	NMF	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X^2 = 146,64^*$	$X^2 = 76,62^*$	$X^2 = 26,44^*$	$X^2 = 25,145^*$
d.m.s. 5%		43,20		
Cont. - Ten.	218,0 (p<0,05)*	78,0 (p<0,05)*	80,0 (p<0,05)*	85,0 (p<0,05)*
Cont. - Ind.	143,0 (p<0,05)*	59,5 (p<0,05)*	53,0 (p<0,05)*	55,5 (p<0,05)*
Cont. - Dex.	191,0 (p<0,05)*	37,0 (p>0,05)ns	84,5 (p<0,05)*	53,5 (p<0,05)*
Cont. - Met.	175,0 (p<0,05)*	72,5 (p<0,05)*	23,0 (p>0,05)ns	23,0 (p>0,05)ns
Ten. - Ind.	75,0 (p<0,05)*	18,5 (p>0,05)ns	27,0 (p>0,05)ns	29,50 (p>0,05)ns
Ten. - Dex.	27,0 (p<0,05)*	115,0 (p<0,05)*	4,5 (p>0,05)ns	31,50 (p>0,05)ns
Ten. - Met.	43,0 (p>0,05)ns	5,5 (p>0,05)ns	57,0 (p<0,05)*	62,0 (p<0,05)*
Ind. - Dex.	48,0 (p<0,05)*	96,5 (p<0,05)*	31,5 (p>0,05)ns	2,0 (p>0,05)ns
Ind. - Met.	32,0 (p>0,05)ns	13,0 (p>0,05)ns	30,0 (p>0,05)ns	32,5 (p>0,05)ns
Dex. - Met.	16,0 (p>0,05)ns	109,5 (p<0,05)*	61,5 (p<0,05)*	30,5 (p>0,05)ns

PERÍODO EXPERIMENTAL DE 28 DIAS

TESTE ESTATIST.	NMF	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X^2 = 53,650$	$X^2 = 63,177$	$X^2 = 19,528$	$X^2 = 22,468$
d.m.s. 5%		43,20		
		Comp. Múlt.		
Cont. - Ten.	71,0 (p<0,05)*	100,0 (p<0,05)*	84,50 (p<0,05)*	90,0 (p<0,05)*
Cont. - Ind.	71,5 (p<0,05)*	57,0 (p<0,05)*	45,0 (p<0,05)*	33,5 (p>0,05)ns
Cont. - Dex.	147,0 (p<0,05)*	43,5 (p<0,05)*	32,50 (p>0,05)ns	34,0 (p>0,05)ns
Cont. - Met.	78,0 (p<0,05)*	45,0 (p<0,05)*	23,0 (p>0,05)ns	46,5 (p<0,05)*
Ten. - Ind.	0,50 (p>0,05)ns	43,0 (p>0,05)ns	39,5 (p>0,05)ns	56,5 (p<0,05)*
Ten. - Dex.	76,0 (p<0,05)*	143,5 (p<0,05)*	52,0 (p<0,05)*	56,0 (p<0,05)*
Ten. - Met.	7,0 (p>0,05)ns	54,5 (p<0,05)*	61,5 (p<0,05)*	46,5 (p<0,05)*
Ind. - Dex.	75,5 (p<0,05)*	100,5 (p<0,05)*	12,5 (p>0,05)ns	0,5 (p>0,05)ns
Ind. - Met.	6,50 (p>0,05)ns	11,5 (p>0,05)ns	22,0 (p>0,05)ns	10,0 (p>0,05)ns
Dex. - Met.	69,0 (p<0,05)*	89,0 (p<0,05)*	9,5 (p>0,05)ns	9,5 (p>0,05)ns

Legenda: NMF: densidade de volume dos macrófagos/células microscópicamente semelhantes FC: densidade de volume das fibras colágenas TG: densidade de volume do tecido granulomatoso RC: densidade de volume da região central
 X^2 = Teste estatístico de Friedmana F = Teste F ns = Teste estatístico não significativo ** = Teste estatístico significativo

TABELA 8: Teste de Friedman e das Comparações Múltiplas objetivando constatar diferenças significativas entre os grupos no decorrer do tempo.

GRUPO CONTROLE				
Teste Estat.	NM/F	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X_2^2 = 154.57^*$	$X_2^2 = 54.63^*$	$X_2^2 = 6.574^{ns}$	$X_2^2 = 20.644^*$
d.m.s. 5%	68,58			
TEMPO	Comp. Múlt.			
7 - 14 dias	-42,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-98,0 ($p < 0.05$) [*]	não aplicado	29,50 ($p > 0.05$) ^{ns}
7 - 21 dias	-187,5 ($p < 0.05$) [*]	-38,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	não aplicado	43,00 ($p > 0.05$) ^{ns}
7 - 28 dias	-118,0 ($p < 0.05$) [*]	-125,5 ($p < 0.05$) [*]	não aplicado	73,50 ($p < 0.05$) [*]
14 - 21 dias	-145,0 ($p < 0.05$) [*]	-59,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	não aplicado	13,50 ($p > 0.05$) ^{ns}
14 - 28 dias	-75,5 ($p < 0.05$) [*]	-27,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	não aplicado	44,0 ($p > 0.05$) ^{ns}
21 - 28 dias	69,5 ($p < 0.05$) [*]	-87,0 ($p < 0.05$) [*]	não aplicado	30,5 ($p > 0.05$) ^{ns}
GRUPO INDOMETACINA 100mg/dia				
Teste Estat.	NM/F	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X_2^2 = 95.404^*$	$X_2^2 = 53.778^*$	$X_2^2 = 15.475^*$	$X_2^2 = 12.086^*$
d.m.s. 5%	68,58			
TEMPO	Comp. Múlt.			
7 - 14 dias	-66,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-107,5 ($p < 0.05$) [*]	35,50 ($p > 0.05$) ^{ns}	-31,50 ($p > 0.05$) ^{ns}
7 - 21 dias	-134,5 ($p < 0.05$) [*]	-99,5 ($p < 0.05$) [*]	17,00 ($p > 0.05$) ^{ns}	-16,0 ($p > 0.05$) ^{ns}
7 - 28 dias	-137,0 ($p < 0.05$) [*]	-92,0 ($p < 0.05$) [*]	-17,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	37,0 ($p > 0.05$) ^{ns}
14 - 21 dias	68,0 ($p < 0.05$) [*]	-8,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	-18,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	15,5 ($p > 0.05$) ^{ns}
14 - 28 dias	-70,5 ($p < 0.05$) [*]	15,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-76,0 ($p < 0.05$) [*]	68,5 ($p < 0.05$) [*]
21 - 28 dias	-2,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	7,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-54,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	53,5 ($p > 0.05$) [*]
GRUPO TENOXICAM 20 mg/dia				
Teste Estat.	NM/F	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X_2^2 = 47.944^*$	$X_2^2 = 25.147^*$	$X_2^2 = 19.841^*$	$X_2^2 = 20.104^*$
d.m.s. 5%	68,58			
TEMPO	Comp. Múlt.			
7 - 14 dias	-30,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-90,0 ($p < 0.05$) [*]	39,50 ($p > 0.05$) ^{ns}	-20,0 ($p > 0.05$) ^{ns}
7 - 21 dias	-44,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	-117,0 ($p < 0.05$) [*]	69,50 ($p < 0.05$) [*]	-69,5 ($p < 0.05$) [*]
7 - 28 dias	-109,5 ($p < 0.05$) [*]	-52,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	54,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	-37,5 ($p > 0.05$) ^{ns}
14 - 21 dias	-13,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-27,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	30,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	-49,5 ($p > 0.05$) ^{ns}
14 - 28 dias	-79,0 ($p < 0.05$) [*]	38,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	14,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	-17,5 ($p > 0.05$) ^{ns}
21 - 28 dias	-65,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	65,0 ($p > 0.05$) ^{ns}	-15,5 ($p > 0.05$) ^{ns}	32,0 ($p > 0.05$) ^{ns}

CONTINUAÇÃO

GRUPO DEXAMETASONA 4mg/dia

Teste Estat	NM/F	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X^2 = 43.301^*$	---	$X^2 = 46.298^*$	$X^2 = 32.535^*$
TESTE F	---	101.00*	---	---
d.m.s. 5%	68,58	4,35 e 4,57	68,58	68,58
TEMPO	Comp. Múlt.	Tukey	Comp. Múlt.	Comp. Múlt.
7 - 14 dias	75,5 (p<0,05)*	-6,09 (p<0,05)*	83,0 (p<0,05)*	-76,0 (p<0,05)*
7 - 21 dias	-96,5 (p<0,05)*	-1,63 (p>0,05) ^{ns}	86,0 (p<0,05)*	-73,0 (p<0,05)*
7 - 28 dias	-83,0 (p<0,05)*	-14,5 (p<0,05)*	13,0 (p>0,05) ^{ns}	-15,0 (p>0,05) ^{ns}
14 - 21 dias	-21,0 (p>0,05) ^{ns}	4,46 (p<0,05)*	3,0 (p>0,05) ^{ns}	3,0 (p>0,05) ^{ns}
14 - 28 dias	-7,5 (p>0,05) ^{ns}	-8,44 (p<0,05)*	-70,0 (p<0,05)*	61,0 (p>0,05) ^{ns}
21 - 28 dias	13,5 (p>0,05) ^{ns}	-12,9 (p<0,05)*	-73,0 (p<0,05)*	58,0 (p>0,05) ^{ns}

GRUPO METOTREXATO 50 mg/semana

Teste Est.	NM/F	FC	TG	RC
FRIEDMAN	$X^2 = 118.061^*$	$X^2 = 72.88^*$	$X^2 = 4.365^{ns}$	$X^2 = 1.706^{ns}$
d.m.s. 5%	68,58			
TEMPO	Comp. Múlt.			
7 - 14 dias	-70,5 (p<0,05)*	-32,0 (p>0,05) ^{ns}	não aplicado	não aplicado
7 - 21 dias	-125,5 (p<0,05)*	-114,5 (p<0,05)*	não aplicado	não aplicado
7 - 28 dias	-168,0 (p<0,05)*	-117,5 (p<0,05)*	não aplicado	não aplicado
14 - 21 dias	-55,0 (p>0,05) ^{ns}	-82,5 (p<0,05)*	não aplicado	não aplicado
14 - 28 dias	-97,5 (p<0,05)*	-115,5 (p<0,05)*	não aplicado	não aplicado
21 - 28 dias	42,5 (p>0,05) ^{ns}	-3,0 (p>0,05) ^{ns}	não aplicado	não aplicado

Legenda: RC - densidade de volume da região central do granuloma X^2 - Teste estatístico de Friedman * - significativo ao nível de 5% ns - não significativo * - grupo com 66 repetições NM/F - densidade de volume de macrófagos/células microscopicamente semelhantes FC - densidade de volume das fibras colágenas TG - densidade de volume do tecido granulomatoso

Gráfico I: Concentração do corante azul de Evans (em μg) presente no foco inflamatório agudo induzido pela Placa microbiana dental em diferentes concentrações.

Gráfico II: Percentual de Inibição do exsudato inflamatório agudo proporcionado pela Indometacina nas concentrações de 75 e 100 mg no modelo induzido pela carragenina

Gráfico III: Percentual de Inibição do exsudato Inflamatório agudo proporcionado pela Indometacina, nas concentrações de 75 e 100 mg no modelo induzido pela placa microbiana dental.

Gráfico IV: Percentual de Inibição do exsudato Inflamatório agudo no modelo induzido pela carragenina.

Gráfico V: Percentual de Inibição do exsudato Inflamatório agudo no modelo Induzido pela placa microbiana dental.

Gráfico VI: Percentual de Inibição do exsudato Inflamatório agudo no modelo Induzido pela paracoccidiodina

GRÁFICO VII: Demonstrativo do peso úmido (P.U.) dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental.

GRÁFICO VIII: Percentual de Inibição dos pesos úmido dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental

GRÁFICO IX: Demonstrativo do peso seco (P. 3.) dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental.

GRÁFICO X: Percentual de Inibição do peso seco dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental

GRÁFICO XI: Demonstrativo do peso diferencial (P. D.) dos granulomas induzidos pela placa microbiana dental.

GRÁFICO XII: Percentual de Inibição do peso diferencial apresentado pelos fármacos testados

GRÁFICO XIII: Densidade do volume ocupado pelas fibras colágenas no granuloma

GRÁFICO XIV: Densidade do volume ocupado pelos macrófagos no granuloma

GRÁFICO XV: Densidade do volume ocupada pelo tecido granulomatoso

GRÁFICO XVI: Densidade do volume ocupada pela região central de necrose.

GRÁFICO XVII: Percentual de Inibição da densidade do volume ocupada pelas fibras colágenas.

GRÁFICO XVIII: Percentual de Inibição da densidade do volume ocupado pelos macrófagos

GRÁFICO XIX: Percentual de Inibição da densidade do volume ocupado pelo tecido granulomatoso

GRÁFICO XX: Percentual de Inibição da densidade de volume ocupada pela região central de necrose

GRÁFICO XXI: Percentual de aumento da densidade do volume ocupado pelo tecido granulomatoso

GRÁFICO XXII: Percentual de aumento da densidade do volume ocupada pela região central de necrose.

Percentual de aumento da densidade do volume ocupada pelo tecido granulomatoso

Percentual de aumento da densidade de volume ocupada pela região de necrose

GRÁFICO XXIII: Percentual de aumento da densidade de volume das fibras colágenas