
DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Didaticamente o processo inflamatório agudo é subdividido em fases. Entretanto, como sabemos, durante esse processo são gerados mediadores químicos que atuam indistintamente em todas as suas fases, podendo, em função da intensidade do agente flagógeno, haver a sobreposição das mesmas.

Outro aspecto que deve ser aprofundado é o conhecimento relativo aos mecanismos envolvidos na indução do processo inflamatório agudo. Para tanto comparamos o mecanismo de ação dos fármacos antiinflamatórios em três períodos e modelos experimentais induzidos por agentes flagógenos de diferentes intensidade (fraca, média e forte).

Em relação à análise dos mecanismos responsáveis pelo efeito antiinflamatório crônico, optamos por estudá-los no modelo experimental induzido pela placa microbiana dental, considerando a sua semelhança com os processos patológicos de interesse à odontologia, particularmente, na doença periodontal inflamatória.

Justificamos a ênfase na doença periodontal pelo fato de que, com o recente avanço nas áreas de microbiologia, imunologia e patologia, tornou-se possível a identificação e o controle de algumas das bactérias responsáveis pelo seu desencadeamento e progressão. Além do que, atualmente tem sido atribuída acentuada importância ao bloqueio farmacológico dos produtos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico, bem como de outras citocinas e fatores de crescimento produzidos pelos macrófagos e demais células presentes no foco inflamatório.

Ressaltamos, ainda, que o estudo da modulação farmacológica dos produtos de síntese e secreção dos macrófagos fornecerá importantes informações relativas ao entendimento dos mecanismos, também, envolvidos em outras patologias de interesse odontológico como a osteomielite e as lesões inflamatórias periapicais.

Portanto, os mecanismos envolvidos na modulação farmacológica do processo inflamatório pelos fármacos antiinflamatórios não esteróides (indometacina e tenoxicam), esteróides (dexametasona) e citostático (metotrexato), serão discutidos em um prisma genérico, com ilações a respeito de patologias específicas, quando necessárias. Por motivos didáticos e visando a melhor compreensão dos fatos dividiremos o presente capítulo em subitens.

6.1. EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO AGUDO

Objetivando estudar a participação dos produtos da ciclooxigenase no processo inflamatório agudo, induzido pela placa microbiana dental e carragenina, em função do tempo, bem como o efeito da concentração do fármaco em relação à inibição do exsudato inflamatório induzido por esses agentes flogógenos, administraramos o Inibidor (Indometacina) daquela enzima nas concentrações de 75 e 100 mg, segundo a tabela 2, pág. 99

A diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05\%$) entre os perfodos de 1 e 6 horas, Indicou o período de duração do efeito do fármaco. Com base nesse dado, podemos deduzir que a participação dos produtos da ciclooxigenase, nos dois modelos estudados, ocorreu mais acentuadamente a partir de uma hora, tendo sido mais intenso na fase inicial do modelo induzido pela placa microbiana dental (PMB), demonstrado pela maior potência Inibitória (redutora) apresentada pela Indometacina no período compreendido entre 1 e 3 horas (TABELA 2; GRÁFICOS II, III), pág. 99 e 108.

Esse resultado, possibilitou-nos inferir que a placa microbiana dental, em decorrência da estimulação flogógena inicial ser mais intensa, induza uma reação necrótica mais acentuada, capaz de gerar substâncias tóxicas lesivas ao endotélio vascular e estimular à síntese das prostaglandinas e de outros mediadores químicos capazes de aumentar a permeabilidade vascular, dentre os quais a metabolização de LTB₄ a partir do LTA₄ e LTC₄ liberado no local da inflamação, aumenta a permeabilidade vascular, a exsudação plasmática e a concentração do corante no foco inflamatório (TABELA 3), pág. 100.

Ainda com base nesse resultado, e considerando que as endotelinas ET-1 e ET-3, quando produzidas em baixa concentração, produzem efeito vasodilatador dependente de uma baixa concentração de PGs, capaz de aumentar a produção de TNF, estimulando a expressão da enzima óxido nítrico sintase e a produção do óxido nítrico; o reduzido efeito apresentado pela Indometacina no modelo da carragenina, pode indicar que esse agente flogógeno produza, em uma hora, essas endotelinas em menor quantidade do que a PMD, estimulando, consequentemente, a produção do óxido nítrico.

A diminuição do efeito da Indometacina, nos dois modelos experimentais (carragenina e placa microbiana dental), a partir de 3 horas (GRÁFICO II, III), demonstra o decréscimo da produção e da participação das prostaglandinas na fase tardia do processo inflamatório agudo induzidos pela PMB e CG, Indicando que apesar desses prostanoïdes serem importantes na indução e na manutenção do processo inflamatório, até 3 horas, após o referido período, também, havia a produção de outros mediadores químicos, possivelmente relacionados à quimiotaxia dos neutrófilos, não bloqueados pela Indometacina.

Outro dado que podemos extraír da tabela 4 é o aumento de potência apresentada pela Indometacina, no modelo induzido pela PMD, comparativamente ao modelo da CG, em 6 horas. Esse resultado, sugere-nos que a PMD, possivelmente, induza a maior produção de outros agentes quimiotáticos para neutrófilos além dos leucotrienos (PANES et al.¹⁷¹, 1995).

Tal efeito pode ser explicado, com base na inibição do efeito sinérgico que os prostanóides produzidos a partir da ativação da ciclooxigenase apresentam com os produtos resultantes da ativação dos sistemas das cininas e do complemento ($C_{3\alpha}$ e $C_{5\alpha}$) (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993).

Outro mecanismo possível pode ser decorrente do aumento da liberação de histamina pelos mastócitos no local da inflamação, com a consequente redução da migração dos neutrófilos para esse local (HIRASAWA⁸⁶, 1994), resultante da diminuição da concentração de AMPcíclico causada pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas. Ainda, com base nesse dado, é possível concluirmos que a PMD induza maior produção de prostanóides, dentre os quais a prostaciclinina, que media e/ou modula a reação vascular à ET-1, cuja produção provavelmente é mais acentuada no modelo da PMD.

Além do mais, sabe-se que as endotelinas podem causar dilatação arteriolar relacionada ao estímulo das células endoteliais à síntese e secreção de PGs (THERKELSEN et al.²³⁴, 1994). Uma outra consequência da produção desses prostanóides é a geração de produtos tóxicos derivados do oxigênio causadores de lesões microvasculares que aumentam a permeabilidade vascular e o extravasamento protéico.

Portanto, considerando o efeito mais acentuado apresentado pela indometacina no modelo induzido pela PMD, e que esse fármaco, reconhecidamente, produz lesões microvasculares, em decorrência da geração de radicais livres como o radical superóxido, é possível que esse agente flogógeno induza a menor produção desses produtos (radical superóxido) entre 1 e 6 horas.

Como o mecanismo vasodilatador decorrente da produção do óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase estimulada por ET-3 não é inibido pela Indometacina, visto que esse fármaco ao inibir a síntese de prostaglandinas estimula a produção do TNF ativando a óxido nítrico sintetase, o efeito menos acentuado da Indometacina no modelo induzido pela carragenina, pode indicar uma baixa produção de PGs e, consequentemente, que esse agente flogógeno produza essa endotelina em maior quantidade.

Considerando, ainda, que, nesse período experimental, ocorreu acentuada redução na concentração do corante azul de Evans presente no foco inflamatório, no grupo medicado com indometacina 100 mg, comparativamente, ao medicado com a concentração de 75 mg, é lógico concluirmos que a inibição farmacológica desses mediadores e o consequente efeito biológico do fármaco, bem como a duração desse efeito estão diretamente relacionados à dose administrada e, naturalmente, ao aumento da concentração do fármaco no soro, da sua constante de dissociação e da ocupação dos receptores segundo a lei de ação das massas. Possivelmente, o mesmo deve ocorrer em relação aos demais fármacos testados.

6.1.1. MODELO EXPERIMENTAL INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CARRAGENINA E SOL. (MEIO DE CULTURA) DE HANKS

Considerando que a estimulação flogógena gera citocinas vasoativas capazes tanto de aumentar como de diminuir a permeabilidade vascular, exacerbando ou reduzindo o exsudato inflamatório, o estudo da tabela 4, possibilitou-nos verificar que, até o período experimental de 1 hora, a participação dos produtos derivados da ciclo e lipooxigenase foi mínima, pois os seus inibidores (indometacina, tenoxicam e dexametasona) não bloquearam significativamente a formação do exsudato inflamatório comparativamente ao metotrexato, que nesse período foi o fármaco de maior potência antiinflamatória (GRÁFICO IV), pág. 109.

No presente trabalho, o reduzido efeito antiinflamatório proporcionado pelos inibidores da ciclooxigenase, no período experimental de 1 hora, comprova a indução pouco acentuada da síntese das prostaglandinas por esse agente flogógeno (TABELA 4; GRÁFICO IV). Possivelmente, a presença mínima dos prostanoides possa ser interpretada como sendo necessária à modulação do efeito de outros mediadores, como as cintinas e endotelinas (WREN; HILEY; FAN²⁶¹, 1993). Portanto, confirmado a teoria proposta por MONCADA; FERREIRA; VANE¹⁵³ (1973) e ratificada por McGIFF & QUILLERY¹⁴⁷ (1982), segundo o qual, as prostaglandinas amplificariam o aumento da permeabilidade vascular induzida pelas cintinas e produtos derivados do complemento. Por outro lado, sabe-se que as endotelinas modulam a produção de outras citocinas tais como as prostaglandinas, outras endotelinas e do ativador do plasminogênio (WREN; HILLEY; FAN²⁶¹, 1993).

O discreto efeito inibidor apresentado pelos antiinflamatórios não esteróides vem ao encontro do trabalho de WREN; HILEY; FAN²⁶¹ (1993), segundo o qual, a potente citocina vasodilatadora endotelina-3, moduladora da produção de tromboxana A₂, não seria inibida por antiinflamatórios não esteróides tal como a indometacina, sendo esse efeito, possivelmente, explicado pelo fato desse fármaco baixar a concentração de PGs, estimulando a produção do vasodilatador óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase.

Por outro lado, é possível que a carragenina induza a produção em baixa concentração das endotelinas ET-1 e ET-2, cujos receptores ETA e ETB localizados nas células endoteliais e musculares lisas e responsáveis pelo efeito vasoconstritor não sejam inibidos por esses fármacos, explicando assim a menor concentração do corante azul de Evans no foco inflamatório, comparativamente ao da placa dental.

É igualmente importante salientarmos que outras citocinas liberadas no foco inflamatório como: o fator necrótico tumoral (TNF) e o interferon-γ (INF-γ) estimulam a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, pois determinam a ativação gênica da óxido nítrico sintetase para a produção daquele agente vasodilatador (SCHOEDON et al. 205, 1993). Também sabe-se que a baixa concentração de AMPc potencializa a secreção de óxido nítrico (DURIEU-TRAUTMANN et al. 54, 1993). Assim, o menor extravasamento protélico constatado no modelo da carragenina comparativamente ao da placa microbiana dental, sugere que no primeiro modelo, além da produção menos acentuada

de PGs, também haja a menor produção de citocinas estimuladoras da óxido nítrico sintase (IL-1, TNF e INF- γ).

O efeito discretamente mais acentuado da indometacina em relação à dexametasona, constatado nesse período experimental, possivelmente, tenha sido causado pelo bloqueio da síntese de prostaciclina, PGE₂ e AMPc. Esse nucleotídeo em baixa concentração, inibe a produção de ET-1 (DURIEU-TRAUTMANN et al.⁵⁴, 1993), reduzindo o efeito vasodilatador proporcionado pela ativação dos receptores ETB nas células endoteliais, induzida por uma baixa concentração de ET-1 e, consequentemente, diminuindo a produção de óxido nítrico e a permeabilidade vascular.

Relacionado a esse efeito, a diminuição dos sítios de ligação para a endotelina 1 nas células musculares lisas induzida, pela dexametasona, reduzindo o efeito vasoconstritor resultante da ativação dos receptores ETA, também, pode ser um outro mecanismo responsável por esse efeito.

O discreto efeito apresentado pela dexametasona, incitou-nos à ilação de que na fase inicial (1 hora) de permeabilidade vascular induzida pela carragenina, a ativação da ciclooxigenas ocorreu mais acentuadamente, pois caso ambas as vias de metabolização do ácido araquidônico fossem ativadas semelhantemente, teoricamente, o efeito inibidor produzido pela dexametasona deveria ser superior ao proporcionado pela indometacina, o que não ocorreu no presente trabalho. Com base nessa última inferência, podemos deduzir que os produtos resultantes da ativação da 5-lipooxygenase, contrariamente as PGs, exercem menor influência no controle do aumento da fase inicial da permeabilidade vascular induzida pela carragenina, possivelmente, explicada pela reação necrótica inicial induzida por esse agente ser pouco intensa.

Outrossim, com base nesse resultado podemos concluir que o discreto efeito inibidor apresentado pela dexametasona, no período experimental de 1 hora, possivelmente, deveu-se a não interferência com a produção de citocinas vasoativas relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular, tais como: bradicinina, trombina, histamina e trombospodina; visto que a carragenina, comparativamente a placa microbiana dental (PMD), possivelmente, ativa mais acentuadamente a via alternada do complemento, determinando a acentuada produção das anafilotoxinas C3a e C5a capazes de aumentar a permeabilidade vascular e ativar as plaquetas e os mastócitos à produção de histamina. Também é possível que esse fármaco por não inibir a produção de TGF- β (KHALIL¹¹⁷, 1993) estimule a síntese pelos fibroblastos do peptídeo semelhante ao hormônio paratireoidiano (PTHrP), uma citocina com potente ação vasodilatadora (RIAN¹⁸⁷, 1994).

Acreditamos, ainda, que o discreto efeito apresentado pelo fármaco, no período experimental de 1 hora, também possa ser explicado pela inibição da IL-1, a qual age sinergicamente com a α -trombina e com a substância P potencializando o aumento da permeabilidade vascular e a transmigração de neutrófilos (DRAKE et al.⁵³, 1992); bem como pela inibição da produção do fator ativador das plaquetas (HIRASAWA et al.⁹³, 1992).

Além desses efeitos, a dexametasona por inibir a produção de IL-1 pode inativar as metaloproteinases, reduzindo a geração de produtos capazes de ativar o sistema do complemento (JAFARI et al 107, 1989). Um outro mecanismo envolvido pode ser decorrente do estímulo a produção do inibidor do ativador do plasminogênio, resultando na não produção da plasmina e da inibição da geração dos produtos resultantes da degradação da fibrina (KUNG & LAU¹²⁴, 1993).

Com base no discreto efeito apresentado pela dexametasona, e considerando que a produção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase é estimulada por IL-1 e TNF- α , citocinas capazes de serem inibidas por esse fármaco, concluímos que a carragenina não estimula a sua produção em grande quantidade, na fase inicial de permeabilidade vascular.

Contrariamente, o acentuado efeito apresentado pelo metotrexato, nesse período experimental, sugere que na fase inicial do edema induzido pela carragenina, haja a participação de citocinas vasoativas como a ET-3 capazes de estimular o aumento da permeabilidade vascular não inibidas pelos bloqueadores da lipo e ciclooxigenase, porém bloqueadas por fármacos inibidores das mitoses como a actinomicina D e cicloheximida (WREN; HILLEY; FAN²⁸¹, 1993) e, possivelmente, o metotrexato. Também é possível que o metotrexato semelhantemente ao efeito desses fármacos, por meio de um mecanismo capaz de produzir o aumento da produção do RNAm para ET-1 (SUNG et al. 222 1995), potencialize o efeito vasoconstritor da ET-1.

É possível, ainda, que o acentuado efeito antiinflamatório proporcionado pelo metotrexato seja decorrente do seu mecanismo anti-proteásico capaz de inibir as proteases plasmáticas mediante a inibição da síntese do ácido fólico, como sabemos, necessário à produção dos nucleotídeos diretamente envolvidos na produção das coenzimas nucleotídicas (FAD, NAD, Coenzima A) responsáveis pelo funcionamento daqueles sistemas enzimáticos, reduza o aumento inespecífico da permeabilidade vascular, resultando na diminuição da exsudação plasmática, e da consequente liberação dos produtos derivados da ativação dos sistemas enzimáticos das cininas, da coagulação e da plasmina, presentes no plasma extravasado ao nível do foco inflamatório.

Ainda, nessa mesma linha de raciocínio, também, sugerimos a possibilidade de que o metotrexato ao inibir a síntese de ácido fólico impeça a produção de coenzimas nucleotídicas (FAD, NAD e coA) necessárias a ativação e ao funcionamento das metaloproteinases teciduais (VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA²⁴³, 1991), cujos produtos enzimáticos podem causar lesões vasculares aumentando a permeabilidade vascular; e a atividade da óxido-nítrico-sintetase (NOs), geradora do óxido nítrico/(EDRF), um potente agente vasodilatador (BOYDOUN et al. 24, 1993).

Com base no trabalho de DURIEU-TRAUTMANN et al. 54 (1993) que demonstraram a potencialização pelo AMPc da produção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase estimulada por IL-1 e TNF, entendemos que esse fármaco por inibir a síntese de PGE₂

e TNF reduza a produção desse nucleotídeo e, consequentemente, de óxido nítrico, diminuindo a permeabilidade vascular.

Outro possível mecanismo pelo qual o metotrexato inibe a ativação das metaloproteínases pode ser causado pela inibição da enzima ornitina descarboxilase, consequente diminuição da concentração de AMPc resultante da inibição da síntese das PGs e da síntese da ornitina (substrato da ornitina descarboxilase) decorrente da inibição da produção da coenzima NADH necessária à redução do grupo carboxílico γ do ácido glutâmico, bem como da diminuição da acetilcoA necessária a acetilação do ácido glutâmico a ácido N-acetilglutâmico, outra via metabólica de síntese da ornitina (WAHL & CORCORAN²⁴⁷, 1993).

Como a ornitina é um intermediário da síntese de arginina, sendo o substrato necessário ao funcionamento da enzima ornitina carbamoltransferase para a produção da citrulina, a qual, por ação de mais duas enzimas: a argininosuccinato sintetase e argininosuccinase produz arginina (SCHOEDON et al.²⁰⁵, 1993); entendemos que o efeito inibidor da síntese da ornitina, e, consequentemente, da arginina; associado ao efeito antioxidante bloqueador do oxigênio molecular e ao efeito inibidor da síntese do co-fator tetrahidroxibiopterina (BH₄) por bloqueio do nucleotídeo NADPH, necessário à sua síntese (SCHOEDON et al.²⁰⁵, 1993), também, estão diretamente relacionados ao acentuado efeito inibidor da permeabilidade vascular apresentado por esse fármaco, pois reduz a produção do vasodilatador óxido nítrico.

Um outro mecanismo responsável por esse efeito decorre do fato do metotrexato ao inibir a formação do doador metil S-adenosil metionina bloqueie outras reações celulares de metilação, particularmente, as produzidas pela aminoimidazole carboxamidribonucleotídeo (AICAR) transformilase, causando o acúmulo intracelular de AICAR e a secreção do potente autacóide antiinflamatório adenosina, principalmente, pelas células endoteliais e fibroblastos (CRONSTEIN; NAME; OSTAD³⁹, 1993).

A presença de adenosina no local da inflamação pode reduzir a permeabilidade vascular por meio de mecanismos diretos e indiretos. Indirectamente, pode reduzir o aumento de permeabilidade vascular da fase histamino-dependente mediante inibição da produção dos fatores estimuladores da secreção da histamina produzidos pelos macrófagos, monócitos e plaquetas, diminuindo a degranulação dos mastócitos (CRONSTEIN³⁷, 1992). Directamente, tem sido sugerida a possibilidade da adenosina ocupar competitivamente os receptores para histamina (KENDALI; FIRTH¹¹⁶, 1993), para endotelina-3, e para o fator protéico redutor da permeabilidade vascular liberado pelas plaquetas (HASOLTON & ALEXANDER⁸⁹, 1992). Ela também pode ocupar os receptores A₂ localizados nos basófilos, que ao serem ativados suprimem a secreção das aminas vasoativas histamina e serotonina por essas células (CRONSTEIN; NAME; OSTAD³⁹, 1993).

Em 3 horas (GRÁFICO IV), o aumento da potência antiinflamatória dos quatro medicamentos testados indicou a maior participação dos produtos da ciclo e lipooxigenase, conforme pode ser constatado pelo aumento dos percentuais de inibição do exsudato inflamatório proporcionado pela indometacina, tenoxicam e dexametasona.

O acentuado efeito apresentado pelo metotrexato, ainda, nesse período experimental, confirma os trabalhos de WILLIAMS; TOPLEY; WILLIAMS²⁵⁶ (1994) e de CROINSTEIN³⁸ (1992), segundo os quais, o metotrexato inibiria a produção de PGE₂ e de LTB₄. Entretanto, os autores não explicaram os mecanismos envolvidos na inibição desses eicosanóides. Na tentativa de esclarecer-lo, sugerimos que o metotrexato ao inibir as proteases plasmáticas, reduza à síntese e secreção de mediadores químicos como as cininas, diminuindo à produção das prostaglandinas, que segundo TERRAGNO et al.²³³ (1975) aumentam a atividade da enzima PGE-9-cetoreducetase.

Considerando, também, que a produção das prostaglandinas a partir do ácido araquidônico está diretamente relacionada com a participação dos sistemas enzimáticos dependentes dos co-fatores produzidos pelo metabolismo do ácido fólico; e, tendo em vista, que o metotrexato ao inibir a síntese desse metabólito impede a produção de coenzimas necessárias à síntese dos prostanóides, entendemos que a inibição desse metabólito pelo fármaco contribui para a redução da síntese de PGE₂.

Relacionado a esse efeito, acreditamos, ainda, que a inibição da geração de radicais livres decorrentes do bloqueio da síntese de PGE₂ pelas células endoteliais, da secreção do íon superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em decorrência da ocupação dos receptores A₁ nos neutrófilos, inibindo o processo de fagocitose dessas células e reduzindo o extravasamento na região inflamada (CRONSTEIN; NALME; OSTAD³⁹ 1993), reduza a agressão ao endotélio vascular, diminuindo a exsudação plasmática.

Outro resultado que merece destaque é o acentuado efeito antiinflamatório apresentado pelo tenoxicam, somente no período de 3 horas. Tal resultado associado ao reduzido efeito apresentado, no período de 6 horas (TABELA IV), sugere que o tenoxicam age quase que exclusivamente inibindo a síntese das prostaglandinas, não influenciando a fase histamino-dependente e a síntese dos leucotrienos, nem impedindo após esse período experimental a formação dos imunocomplexos, necessários à ativação do complemento, ou a geração de outros mediadores quimiotáticos (IL-1, IL-8, CINC) para neutrófilos, possivelmente, relacionados à fase tardia do processo inflamatório agudo.

Considerando que a produção de PGH₂ a partir do ácido araquidônico, além da ciclo-oxigenase necessita da presença do O₂ e de co-fatores (VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA²⁴³, 1991), é possível que, em parte, o efeito antiinflamatório apresentado pelo tenoxicam no período entre 1 e 3 horas, também, possa ser atribuído a inibição do oxigênio livre produzido no local da inflamação, e necessário ao funcionamento dos sistemas enzimáticos relacionados ao metabolismo do ácido araquidônico, fonte geradora dos prostanóides e eicosanóides. Além do que, esse efeito por reduzir os produtos tóxicos derivados do metabolismo do oxigênio (radicais livres) potencialmente lesivos aos vasos, gerados quando da síntese das PGs, contribua para a redução da permeabilidade vascular.

Esse resultado, igualmente, sugere-nos que o mecanismo redutor do oxigênio livre presente no local da inflamação é particularmente importante na redução do aumento da permeabilidade vascular, constatado nesse período experimental, comparativamente ao grupo controle, visto que o oxigênio molecular é necessário ao funcionamento da óxido nítrico sintase (NOs) (SCHOEDON et al.²⁰⁵, 1993), cujo produto o óxido nítrico, como sabemos é um potente vasodilatador. Além do que, a redução da liberação de O₂ reduz significamente a produção do radical superóxido (O₂⁻) pelos neutróflos (COLLI et al.³⁴, 1991).

A diminuição da potência antiinflamatória dos inibidores da ciclooxigenase (indometacina e tenoxicam) constatada entre 3 e 6 horas, associada ao efeito redutor do exsudato inflamatório mais acentuado apresentado pela dexametasona e metotrexato (GRÁFICO IV), pág. 109 confirma a participação dos mediadores vasoativos como os leucotrienos (SPECTOR & WILLOUGHBY²¹⁷, 1982), bem como o suposto efeito inibidor de LTB₄ atribuído ao metotrexato (CROSTEIN³⁸, 1992). Segundo esse autor, o metotrexato obsta as modificações pós-transcricionais das proteínas envolvidas na síntese dos leucotrienos.

O acentuado efeito apresentado pela dexametasona em relação à inibição da exsudação plasmática, nesse período experimental, além da inibição da síntese de leucotrienos, também pode ser atribuído ao aumento da síntese do inibidor tipo 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), inibindo a atividade do ativador do plasminogênio, a geração da plasmina e dos produtos resultantes da degradação (fragmentação) da fibrina, capazes de aumentar a permeabilidade vascular e o extravasamento protéico (BLEI¹⁹, 1993). Esse efeito, igualmente, pode ser decorrente da regulação para baixo dos receptores para endotelinas nas células endoteliais, em consequência da diminuição do número de sítios de ligação para essas citocinas, resultando na diminuição da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular por elas induzida (STAMIROVIC; McCARRON; SPATZ²²⁰, 1994).

Por sua vez, o acentuado efeito apresentado pelo metotrexato pode ser atribuído a inibição da produção do óxido nítrico resultante da inativação da óxido-nítrico-sintase (NOs) pelo bloqueio da transcrição da informação genética necessários à sua síntese em RNAm (BAYDOUN et al.²⁴, 1993). Indiretamente, por inibir a PGE₂ reduz a expressão gênica do fator necrótico tumoral alfa (TNF- α), bem como reduzindo a síntese dessa enzima (NOs) (MILANO et al.¹⁵², 1995), igualmente reduz a produção do tetrahidroxipterina (BH₄), um cofator essencial para o funcionamento da NOs, que conjuntamente com o oxigênio molecular e com os cofatores NADPH, FMN e FAD produz óxido nítrico (SCHOEDON et al.²⁰⁵, 1993).

Considerando o efeito semelhante apresentado pela dexametasona nos modelos da carragenina e da placa microbiana dental, e que esse fármaco inibe várias citocinas quimiotáticas e vasodilatadoras, dentre as quais: LB₄, PAF, TNF IL-1, IL-6, LB4, e CINC, indicam que a produção dessas citocinas é semelhante nos dois modelos..

O efeito inibitório mais acentuado apresentado pelo metotrexato, às 6 horas, comparativamente ao efeito apresentado pelos antiinflamatórios esteróides e não esteróides, sugere que esse medicamento, além da redução das PGs (PGE_2) e LTs (LTB_4), bloqueia os receptores E_2 para endotelina-3, como já mencionado, uma potente citocina vasodilatadora que atinge o efeito máximo entre 4 e 8 horas após a estimulação flogógena, não interferindo na ligação das potentes citocinas vasoconstritoras endotelinas 1 e 2 aos receptores E_1 (WREN; HILLEY; FAN²⁶¹, 1993). Além do mais, esse fármaco por inibir a síntese de outras citocinas como o $TNF-\alpha$ reduz a expressão das moléculas de adesão ao endotélio vascular, diminuindo a migração dos neutrófilos para a área inflamada, reduzindo a destruição tecidual, o dano vascular, a permeabilidade vascular e o extravasamento protéico.

Assim, em 6 horas, o acentuado efeito apresentado pelo metotrexato pode ser explicado com base nos trabalhos de CRONSTEIN³⁸(1992) e de WILLIAMS; TOPLEY; WILLIAMS²⁵⁶(1994) que atribuem a esse fármaco efeito inibidor de várias citocinas quimiotácticas, vasodilatadoras e estimuladoras do aumento da permeabilidade vascular, dentre as quais o TNF , PGs e LTB_4 .

Pela análise dos dados constantes nas tabelas 3 e 4, e o fato do corante azul de Evans ligar-se as proteínas plasmáticas extravasadas em decorrência do aumento da permeabilidade vascular; a diferença estatisticamente não significativa ($P>0,05\%$), constatada no decorrer do tempo, em relação à presença do corante no foco inflamatório, sugere que o extravasamento protéico ocorreu durante todo experimento (TABELA 3), confirmando os trabalho de BOLAM et al.²¹ (1974) e de DOHERTY & ROBISON⁵¹ (1975). Os dados constantes nessas tabelas, ainda, demonstraram que o extravazamento protéico foi inibido mais acentuadamente no período compreendido entre 1 e 3 horas, conforme foi demonstrado pela diferença significativa ($P<0,05\%$) entre esses períodos (TABELA 4, GRÁFICO IV), págs. 101 e 109

Considerando o acentuado efeito apresentado pelo metotrexato durante todo o experimento (GRÁFICO IV), deduzimos que no controle do processo inflamatório induzido por agentes como a carragenina, nos quais há acentuada produção dos mediadores químicos resultantes da ativação dos sistemas da coagulação, do complemento e das cininas, assim como dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (LTs e PGs), o emprego dos fármacos citostáticos como o metotrexato, bloqueadores desses sistemas enzimáticos, apresenta vantagem em relação aos antiinflamatórios esteróides (dexametasona) e não esteróides (indometacina e tenoxicam).

Tomando por base a diferença significativa ($P<0,05$) apresentado pelos fármacos em relação ao extravasamento plasmático, entre os períodos de 1 e 3 horas (TABELA 4), concluímos que nesse período experimental os medicamentos testados agiram mais intensamente reduzindo a formação do exsudato inflamatório (GRÁFICO IV). Essa diferença confirmou as alterações bifásicas provocadas pela carragenina citada por

vários autores (VAN ARMAN et al. 23⁹ 1965; NAKAMURA & SHIMIZU 15⁶, 1974; DOHERTY & ROBINSON 5¹, 1975).

6.1.2. MODELO EXPERIMENTAL INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELA PLACA MICROBIANA DENTAL E SOLUÇÃO DE HANKS

Com o objetivo de verificar se havia diferença no decorrer do tempo em relação à intensidade da potência flogística da placa microbiana dental, em diferentes concentrações, diluímos-a segundo as concentrações constantes na tabela 1, pág. 99.

A diferença estatisticamente significativa ($p<0,05\%$) entre os períodos de 1 e 6 horas indicou que o agente flogógeno possuía potência inflamatória crescente, conservando-a nas diferentes concentrações empregadas, ou seja, a placa microbiana dental (PMD), mesmo na concentração de 10 mg/ml de sol. de Hanks, conservou o efeito flogístico capaz de ser empregada para o teste do efeito dos fármacos antiinflamatórios (GRÁFICO I), pág. 108.

Tomando por base trabalhos anteriores, dentre os quais o de AKATSU⁵ (1991)** que preparou extratos de peptídeoglicanas da placa microbiana dental, procuramos simplificar a sua preparação, objetivando obter fragmentos da parede de microorganismos que a compõem. Para isso, baseamo-nos em um trabalho anterior executado no Departamento de Patologia da FOB, USP por TAVEIRA* (1982), segundo o qual, a remoção da matriz da placa microbiana dental por agentes extractores aumentou o seu poder flogógeno, na fase aguda do processo inflamatório.

Com base nesse último estudo, removemos as proteínas de alto e baixo peso molecular constituintes da matriz da placa, os ácidos nucléicos e os lípideos, de modo que a preparação ficou constituída por fragmentos da placa dental com elevado poder flogógeno. O tratamento, confirmado pela análise estatística dos resultados constantes na tabela 1 e gráfico I e V, possibilitou-nos, com as sucessivas diluições do agente flogógeno, desenvolver um modelo experimental para o teste de fármacos antiinflamatórios bastante eficiente e simples, apresentando vantagem em relação ao modelo induzido pela carragenina, pois melhor reproduz os mecanismos biopatológicos característicos das doenças inflamatórias, nas quais haja acentuada participação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico.

*TAVEIRA, L. A. A. Estudo do poder flogógeno da placa dental íntegra e tratada com diferentes soluções extractoras. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 1988, 152 p. (Tese de Mestrado).

**AKATSU, T. Avaliação das atividades antiexsudativa e antiproliferativa dos antiinflamatórios não esteróides naproxen, ibuprofen, sulindac e glucametacina em modelos inflamatórios produzidos pela inoculação subcutânea de fragmentos da parede celular de microorganismos da placa dental. Bauru, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1991, 220 p. (Tese de Doutorado).

Pela análise da tabela 4 podemos verificar que o processo inflamatório induzido pela placa microbiana dental apresentou características diferentes do induzido pela carragenina, pois o aumento da potência antiinflamatória dos bloqueadores da ciclo e lipooxigenase, bem como a diminuição da potência do metotrexato, já na fase inicial (1 hora), indicou que o mecanismo do aumento da permeabilidade vascular envolve a acentuada participação dos mediadores químicos LTs e PGs (GRÁFICO V e VI), pág. 119.

Tomando por base o efeito redutor da síntese de PGs apresentado pelo tenoxicam já no período de 1 hora, podemos inferir que a placa microbiana dental comparativamente a carragenina, em decorrência da acentuada destruição tecidual promovida na fase inicial da estimulação flogógena, também, induz mais precocemente a geração de produtos tóxicos derivados do metabolismo do oxigênio livre presente no local da inflamação capazes de produzirem lesões microvasculares exacerbando o extravasamento protéico. Em consonância com essa ilação, citamos o fato desse fármaco, ter a sua potência aumentada comparativamente ao efeito apresentado no modelo induzido pela carragenina.

Possivelmente, um dos mecanismos responsáveis pelo aumento de potência do tenoxicam é a inibição da geração do radical superóxido (O_2^-) (COLLI et al.³⁴, 1991), capaz de estimular as células endoteliais a secreção do fator de Von Willebrand (vWF), resultando na diminuição da adesão das plaquetas ao tecido conjuntivo subendotelial e da ativação do fator X da via intrínseca da coagulação, causando a formação dos fibrinopeptídeos estimuladores do aumento da permeabilidade vascular e da quimiotaxia dos neutrófilos (VISCHER et al.²⁴⁵, 1995).

Além desse mecanismo vários outros também estão envolvidos na redução da geração dos produtos tóxicos derivados do oxigênio (radicais livres oxidam os metionil nas antiproteases) pelo tenoxicam, dentre os quais citamos como os mais importantes: o bloqueio da fase de propagação da reação de peroxidação dos lípideos e das proteínas; a inibição da síntese das PGs; a ativação das antiproteases (alfa-1-antitripsina) e a inibição das proteases.

Contudo, devemos, ainda, alertar que o efeito redutor da permeabilidade vascular apresentado pelo tenoxicam, uma hora após a estimulação flogógena, igualmente, pode ser decorrente da inibição das citocinas vasodilatadoras e estimuladoras do aumento da permeabilidade vascular, entre os quais: a substância P, a IL-8, a IL-1, o TNF e a α -trombina (SACERDOTE & PANERA¹⁹⁶, 1994; ROBBINS et al.¹⁸⁹, 1989; TATAKIS²³⁰, 1993), bem como da inibição da atividade das enzimas proteoglicanases e colagenases (VIGNON et al.²⁴⁴, 1991), enzimas diretamente relacionadas com as alterações protéicas, teciduais capazes de ativar o complemento produzindo anafilotoxinas que têm a propriedade de liberar a histamina contida nos mastócitos (CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982).

Com base no trabalho de KUNG & LAU¹²⁴ (1993) que atribuem ao tenoxicam efeito bloqueador dos receptores do tipo uroquinase ativador do plasminogênio presente nos macrófagos, e considerando que essa enzima se encontra presente no sangue, podendo

macrófagos, e considerando que essa enzima se encontra presente no sangue, podendo ativar o plasminogênio que é produzido ao nível da parede vascular, entendemos que o tenoxicam por impedir a sua ativação reduzindo a produção de plasmina e a geração dos produtos resultantes da ativação dos sistemas das cininas, da coagulação e do complemento, capazes de produzirem vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular diminuindo o extravasamento protéico à 1 hora.

Um outro resultado extremamente interessante e que merece um estudo mais acurado foi a perda do efeito inibidor da exsudação plasmática apresentado pelo tenoxicam após 1 hora. Esse resultado sugere que o tenoxicam por diminuir o O₂ livre no local de inoculação do agente flogógeno, potencialize o efeito vasoconstritor da ET-1 causando hipoxia tecidual e a diminuição da tensão do oxigênio no interior das células, reduzindo a fosforilação oxidativa e, consequentemente, a produção de ATP. Contudo, após 1 hora pode haver, concomitantemente com a diminuição da tensão do O₂ em nível mitocondrial, estimula o aumento do cálcio citosólico e a ativação das fosfolipases aumentando a degradação (fragmentação) dos fosfolídeos presentes na membrana celular, o que resulta no aumento da concentração de AMPc, em consequência da ativação da adenilciclase pelas PGs.

O aumento do AMPc resultante dessa ativação enzimática ativa a fosfofrutoquinase estimulando a glicólise anaeróbica e a produção do ácido láctico que baixa o pH, propiciando um pH ótimo para a secreção e a atividade das enzimas lisossomais capazes de causar lesões vasculares, proporcionando o aumento da exsudação plasmática. Esse nucleotídeo além de suprimir a produção do inibidor do plasminogênio (PA-I) potencializa a produção do óxido nítrico induzida pela IL-1 e TNF (DURIEU-TRAUTMANN et al.⁵⁴, 1993). Além do que, o aumento da concentração intracelular de Ca⁺⁺, igualmente, estimula a oxidação pela ONs de um dos átomos do nitrogênio guanidínico da L-arginina em óxido nítrico capaz de induzir a vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular (EMORI; HIRATA; MARUMO⁵⁸, 1991).

O acentuado efeito apresentado pelos antiinflamatórios não esteróides (indometacina) sugere que esse fármaco a exemplo do efeito apresentado pelos salicilatos, além da inibição da ciclooxigenase, igualmente, promova a quebração dos íons essenciais à atividade enzimática, resultando no desacoplamento da fosforilação oxidativa; na inibição da glicólise e da produção do ATP necessário ao funcionamento dos sistemas enzimáticos relacionados à degranulação dos mediadores químicos vasoativos pelos mastócitos e basófilos, bem como no caso do tenoxicam, a inibição da geração dos produtos tóxicos derivados do oxigênio capazes de lesar a parede endotelial, aumentando a permeabilidade vascular e o extravasamento protéico.

Devemos, ainda, ressaltar, que os fármacos antiinflamatórios não esteróides, por inibirem a adenilciclase, podem reduzir o nível intracelular do AMPc necessário à ativação da proteína quinase, impedindo a fosforilação da membrana perigranular, tornando-a incapaz de se unir com a membrana celular, diminuindo a degranulação dos mediadores vasoativos pelos mastócitos e basófilos (COTRAN; KUMAR ROBBINS³⁶, 1989)..

Relacionado ao mecanismo da permeabilidade vascular, devemos, também, citar a possibilidade dos fármacos inibidores da ciclooxigenase não interferirem na acentuada produção das endotelinas 1 e 2, e na ocupação de seus respectivos receptores, que em decorrência do bloqueio dos prostanoídes vasodilatadores PGE₂ e PGI₂, têm os seus efeitos potencializados (WREN; HILEY; FAN²⁶¹, 1993). Além do que, o efeito inibidor da síntese de prostaglandinas (PGIs), por diminuir o efeito inibidor da agregação plaquetária, decorrente do aumento da concentração intracelular de AMPc induzido pela ET-1, via produção da prostaciclina (PGI₂), aumenta a liberação do fator ativo de natureza protéica redutor da permeabilidade vascular (HASOLTON & ALEXANDER⁸⁹, 1992).

Já, a diminuição da permeabilidade vascular promovida pela dexametasona comparativamente ao modelo da carragenina, no período experimental de 1 hora, em parte, pode ser atribuída à inibição dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (LTs e PGs), bem como decorrente da produção pelas células presentes no tecido conjuntivo agredido por citocinas vasoativas, tais como: IL-1, IL-8, TNF- α , substância P, PAF e, principalmente, da CINC (HIRASAWA et al.⁹⁸, 1992), pois a exemplo do que ocorre em humanos, algumas dessas citocinas, como a IL-8; além do efeito quimiotáctico, também, estimulam a produção do radical superóxido e de água oxigenada (H₂O₂), assim como ativa NADPH oxidase (BICKEL¹⁸, 1993). Esse efeito, igualmente, indica que a PMD produza essas citocinas em maior quantidade do que a carragenina.

Como a dexametasona inibe a produção das citocinas IL-1 e TNF, estimuladoras da ativação das metaloproteinases, presentes no tecido conjuntivo (gelatinases, collagenases) capazes de alterá-lo bioquimicamente; ela impede a formação do ativador do plasminogênio e a ativação do sistema do complemento, respectivamente, diminuindo a produção dos peptídeos vasoativos (YAMAMOTO et al.²⁶⁴, 1993) e das anafilotoxinas estimuladoras da produção de histamina pelos mastócitos (JAFARI et al.¹⁰⁷, 1989), bem como da produção do vasodilatador óxido nítrico, decorrente da ativação da óxido nítrico sintetase por essas citocinas. Considerando, ainda, o aumento de potência apresentado pela dexametasona, uma outra inferência possível: é que a placa microbiana dental induza nesse período experimental, a maior produção de LTs, IL-1, FGF, PA e TNF.

Com base na tabela 3, em 1 hora, ficou patente o maior extravasamento protéico causado pela placa microbiana dental (PMD), comparativamente ao extravasamento causado pela carragenina. Portanto, seria lógico supormos que nesse período experimental, em decorrência da acentuada necrose tecidual causada pela PMD, poder-se-iam gerar抗ígenos capazes de formar com os anticorpos circulantes imunocomplexos lesivos à parede vascular, causando maior extravasamento do plasma, que ao contactar com o tecido conjuntivo bioquimicamente alterado, ativaría os sistemas do complemento, da coagulação e fibrinolítico, à produção de mediadores (C3a, C5a, produtos da fragmentação da fibrina, bradiquinina e os fibrinopeptídeos) capazes de causar vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática.

Entretanto, considerando que tanto no modelo induzido pela carragenina como no modelo induzido pela placa microbiana dental foi administrada a mesma dose de metotrexato, tendo apresentado à 1 hora (GRÁFICO V; IV, pág. 109 e 110), no modelo induzido pela PMD, efeito inferior ao observado no modelo induzido pela CG; acreditamos que esse efeito decorra da estimulação flogógena inicial mais potente proporcionada pela PMD, capaz de causar a inibição das proteases plasmáticas responsáveis pelo funcionamento desses sistemas enzimáticos. Portanto, não passíveis de serem bloqueados por aquele fármaco. Um outro dado que indica a participação pouco acentuada desses sistemas, no período experimental de 1 hora, é o fato da indometacina mesmo sendo um ativador do plasminogênio, que reconhecidamente ativa via plasmina os referidos sistemas enzimáticos, apresentar acentuado efeito inibitório da exsudação plasmática.

Outro resultado que merece estudo mais acurado é a diminuição do efeito apresentado pelo metotrexato após o período experimental de 1 hora, comparativamente, ao efeito constatado no modelo da carragenina (GRÁFICOS IV, V págs. 109 e 110). É possível que o discreto efeito apresentado por esse fármaco possa ser explicado por sua baixa concentração no soro e ao nível dos receptores enzimáticos, insuficiente para competir com a concentração ainda elevada de ácido fólico e inibir o ácido araquidônico, produzido em grande quantidade, em decorrência da acentuada destruição celular induzida pela placa microbiana dental, permitindo, por conseguinte, a geração dos mediadores químicos com propriedades vasoativas e de substâncias tóxicas derivadas do oxigênio lesivas ao endotélio vascular.

Uma outra possibilidade é que a PMD estimule a maior produção do peptídeo vasodilatador semelhante ao hormônio paratireoidiano (PTHrP), de maneira que, o metotrexato, semelhantemente ao antibiótico ciclohexamida, inibe a síntese protéica por aumentar a transcrição gênica e estabilizar o RNAm do PTHrP, estimule a produção desse peptídeo. Esse mecanismo, também, justifica a potência mais acentuada apresentada pela dexametasona em relação ao metotrexato, visto que os fármacos corticosteróides inibem a expressão do PTHrP (ROSOL & CAPEN¹⁸², 1992). Ainda, relacionado com esse mecanismo, considerando que semelhantemente a actinomicina D e a ciclohexamida, esse fármaco inibe a síntese protéica, é possível que o metotrexato estimule a produção de endotelina-1 (ET-1), visto que a expressão gênica da ET-1 está relacionada a presença de um repressor gênico, que ao ser inibido por esses fármacos estimule a produção da ET-1. Portanto, o efeito pouco acentuado desse fármaco no período experimental de 1 hora, sugere que a PMD estimule a produção pouco acentuada de ET-1.

Como foi mencionado anteriormente, aumento do efeito dos fármacos antiinflamatórios esteróides (dexametasona) e não esteróides (indometacina e tenoxicam), no período de 1 hora (GRÁFICO V, pág. 110), no modelo induzido pela placa microbiana dental, sugere que esse agente flogógeno devido à presença abundante de substâncias tóxicas particuladas, produza na fase inespecífica de permeabilidade vascular, maior destruição tecidual, resultando na maior liberação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (PGs e LTs), decorrente da

progressiva perda de fosfolipídeos e da fragmentação dos lipídeos resultantes da agressão celular promovida pela estimulação flogógena. Com base nessa constatação podemos concluir que na fase inicial da estimulação flogógena induzida pela PMD, o aumento da permeabilidade vascular e do consequente extravasamento protéico, em grande parte, deveu-se a ação vasodilatadora desses elcosanóides.

Tendo em vista, que a fase tardia do processo inflamatório agudo em relação à duração, apresenta considerável variação podendo se estender de 2 a 40 horas (CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982), entendemos, que o aumento da potência do metotrexato, na fase tardia da permeabilidade vascular, poderia ser explicada por sua maior concentração no soro a partir de 1 hora, suficiente para reduzir, em decorrência do aumento da concentração local da adenosina, a síntese e secreção das prostaglandinas e dos leucotrienos. A esse respeito, CROINSTEIN³⁸ (1992), também, sugeriu que o aumento da concentração da adenosina no local da inflamação, após 1 hora, por ocupar os receptores A₁ dos neutrófilos, além de diminuir a aderência dessas células a parede vascular, igualmente poderia diminuir o dano endotelial decorrente da liberação dos produtos tóxicos derivados do oxigênio, produzidos pelos neutrófilos ativados, reduzindo a permeabilidade vascular.

Em nível molecular, WILLIAMS; TOPLEY; WILLIAMS²⁵⁶ (1994) sugeriram que o metotrexato ao inibir as reações de peroxidação das proteínas e lipídeos impediria a geração de produtos tóxicos derivados do oxigênio. Contudo, os autores não citaram em que fase do processo de peroxidação aquele fármaco agiria. Portanto, considerando que a fase inicial do referido processo é o ataque por radicais capazes de abstrair um dos dois átomos de hidrogênio do carbono localizado entre as duas duplas ligações do ácido graxo poliinsaturado (KRINSKY¹²², 1992), e, que, uma das possíveis fontes desses radicais é a ativação do grupo metila ligado à coenzima B-12 em CH₄ e (CH₃COOH) originando, respectivamente, os radical metila R• e peroxil LOO•; entendemos que o mecanismo antioxidante do metotrexato poderia inibir a fase inicial (posterior ao ataque do grupo oxidrila) do referido processo.

Outro mecanismo envolvido na geração de produtos tóxicos derivados do oxigênio resulta da ativação do sistema enzimático xantina desidrogenase/xantina oxidase (XD/XO), cujas enzimas derivam de um único produto translacional. A conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase pode ocorrer tanto irreversivelmente por proteólise como reversivelmente por oxidação. Ambas enzimas catalizam entre outras reações a oxidação da hipoxantina em xantina e esta em ácido úrico, necessitando para isso, da participação do cofator (NAD+) e de O₂ (HASSOUN et al.⁹⁰, 1994).

Considerando que o metotrexato por ser um inibidor da síntese das coenzimas nucleotídicas necessárias ao funcionamento desse sistema enzimático, bem como por inibir a síntese protéica e a proteólise decorrente do seu efeito antiproteásico, é possível que esse fármaco semelhantemente ao que ocorreu no trabalho de HASSOUN et al.⁹⁰ (1994) com os inibidores da síntese protéica actinomicina D e cicloheximida, também, iniba a produção do sistema XD/XO. Outrossim, o aumento da concentração local da

adenosina pode induzir à sua metabolização em adenina e inosina, que servem de substrato às enzimas aderina e adenosina desaminases originando hipoxantina, a qual, pode ser oxidada pelo sistema XD/XO primeiramente em xantina e logo a seguir em ácido úrico; um antioxidante liposolúvel.

Portanto, acreditamos que o metotrexato por meio de mecanismos dependentes do tempo e da sua concentração no soro, bem como da concentração da adenosina no local da inflamação poderá tanto estimular como inibir a produção do sistema XD/XO. É possível que a administração desse fármaco até o período experimental de 7 dias, em decorrência do aumento da concentração local de adenosina estimule a produção pelo sistema XD/XO de antioxidantes como o ácido úrico, enquanto que a administração prolongada (após 14 dias), em decorrência da redução dos nucleotídeos necessários ao funcionamento do sistema XD/XO a iniba.

Como a oxidação do ácido araquidônico e a consequente produção das prostaglandinas pode ser fonte dos radicais livres, entendemos que a inibição da produção do TNF e PGE₂, indiretamente, também, pode contribuir para o efeito antioxidante apresentado pelo metotrexato, pois uma outra consequência desse efeito, é a redução da ativação das enzimas colagenase e hialuronidase induzidas por IL-1 e TNF- α . Relacionado a esse mecanismo, a inibição do TNF e dos co-fatores essenciais (NADH, FADH, FMN e BH4) necessários ao funcionamento da óxido-nítrico-sintetase, reduz a produção do óxido nítrico e o aumento da permeabilidade vascular (SCHOEDON et al., 205, 1993).

Acreditamos, também, que o efeito direto do fármaco inibindo a enzima dihidrofolase redutase, igualmente, possa reduzir a produção dos produtos tóxicos derivados do oxigênio, visto que uma outra fonte da geração desses produtos é a própria oxidação do ácido fólico à N⁵-metil-FH₄, metionina e S-adenosilmetionina. Portanto, a deficiência de S-adenosilmetionina induzida pelo metotrexato, bloqueando à síntese da espermedina a partir da putrescina, inibindo à sua oxidação e das demais poliaminas presentes no local da inflamação, em decorrência dos processos necróticos, reduz a geração dos produtos tóxicos lesivos à parede endotelial estimuladores do aumento da permeabilidade vascular reduzindo o extravasamento protéico.

Em 6 horas, igualmente, constatamos diferença entre os modelos inflamatórios induzidos pela PMD e CG (GRÁFICOS IV, V), uma vez que no primeiro modelo o efeito apresentado pela indometacina foi semelhante ao da dexametasona e superior ao do metotrexato. Esse resultado sugere que apesar da indometacina não impedir a produção de IL-1 e do TNF, o fármaco semelhantemente a dexametasona pode promover a redução de outros potentes agentes quimiotáticos para neutrófilos, produzidos em consequência da ativação da ciclooxygenase (ROBBINS et al., 189, 1989). O mecanismo redutor da concentração do AMPc causado pela inibição da síntese de PGs, aumentando a liberação da histamina e determinando a redução da migração dos neutrófilos, também, justificaria o acentuado efeito apresentado pelo fármaco nesse período experimental (HIRASAWA et al., 98, 1991).

Considerando, ainda, a relação existente entre a síntese de endotelinas e a de prostaglandinas, uma vez que as endotelinas, particularmente a ET-1 apresenta efeito vasoconstritor induzindo hipóxia tecidual. A indometacina por bloquear a síntese desses prostanoídes vasodilatadores potencializa o efeito vasoconstritor da ET-1, reduzindo a exsudação plasmática (GRASSI-KASSISSE⁸², 1994).

O efeito inibidor da síntese de PGs, mais, especificamente, da síntese de prostaciclina (PGI_2) estimulada por ET-3, apresentado pela indometacina, pode ser um outro mecanismo pelo qual esse fármaco reduz a exsudação plasmática em 6 horas (EMORI; HIRATA; MARUMO⁵⁸, 1991). O possível efeito quelante de íons como o ferro necessário a síntese de XD/XO impedindo a produção do óxido nítrico pela ONs, também, pode contribuir para o efeito inibitório da exsudação plasmática apresentada pelo fármaco.

Por sua vez, o efeito redutor da exsudação plasmática apresentado pela dexametasona pode ser atribuído a inibição das potentes citocinas quimiotáticas para neutrófilos IL-1, TNF, substância P, IL-8, CINC, pois elas aumentam a expressão das moléculas de adesão leucócito-endotélio (ELAM-1) e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1). Além do que, essas citocinas, igualmente, são capazes de estimular a produção do óxido nítrico pela ONs causando vasodilatação (CHARAUD; DANNA; BENY³¹, 1994).

A dexametasona além de inibir a produção das moléculas de adesão celular, também inibe a síntese e secreção das metaloproteinases pelos polimorfonucleares neutrófilos, capazes de destruir a membrana basal reduzindo a safda dos vasos (ODA & KATORI¹⁶¹, 1992). Considerando, ainda, que o TNF ativa a óxido nítrico sintase aumentando a produção de fibronectina, possivelmente em decorrência do aumento da ativação das enzimas GMPC fosfodiesterases pelo óxido nítrico, a dexametasona por ser um inibidor da síntese protéica inibe a síntese daquelas citocinas e a ONs, diminuindo a produção de óxido nítrico e a síntese da glicoproteína fibronectina (PELLEGATTA et al.¹⁷⁵, 1994). Citocinas como a IL-8, TNF e IL-1 podem estimular as células endoteliais à degradação da membrana basal subendotelial, que é uma importante barreira à chegada dos polimorfonucleares neutrófilos no local da inflamação (BARLETT; UNDERWOOD; PARISH¹², 1995). Sendo assim, por inibir a produção dessas citocinas, o fármaco reduz a destruição da membrana basal subendotelial reduzindo transmigração celular e o aumento da permeabilidade vascular.

Associado ao efeito desses fármacos não devemos omitir a possibilidade de que a PMD induza a acentuada produção do pepetídeo vasodilatador, semelhante ao hormônio paratireoidiano (PTHrP), cujo efeito pode ser explicado pelo estímulo da adenilciclase e proteína quinase A, fosfolipase C, proteína quinase C e do aumento intracelular de cálcio, que ativa a óxido-nítrico-sintetase à produção do vasodilatador óxido nítrico, capaz de ser bloqueada pelos glucocorticóides (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992). Considerando, ainda, a semelhança do efeito entre a indometacina e a dexametasona, constatada no presente trabalho, é possível que o primeiro fármaco, também, iniba aquele pepetídeo. Em consonância com esse mecanismo lembramos que a indometacina,

indiretamente, por meio da não interferência com a produção da IL-1 pode regular para baixo os receptores para o PTHrP, reduzindo o seu efeito vasodilatador (TATAKIS²³⁰, 1993).

Tomando por base o efeito apresentado pelo fármacos antiinflamatórios esteróides e não esteróides, no modelo induzido pela placa microbiana dental, comparativamente, aos seus efeitos no modelo da carragenina, sugere a indução, em 6 horas, pela placa microbiana dental, de uma maior produção dos fatores quimiotácticos para neutrófilos, dentre os quais, principalmente, da CINC, pois, considerando que a IL-8 é inibida pela Indometacina; sendo a estrutura molecular da CINC semelhante a da IL-8, é possível que esse fármaco também iniba a produção daquela citocina.

Outra diferença encontrada, em relação ao modelo da carragenina, foi quanto ao efeito antiinflamatório em função do tempo (TABELA 4), que se apresentou no modelo induzido pela PMD estatisticamente não significativa ($P>0,05\%$). Tal resultado revelou que os medicamentos testados apresentaram efeitos antiinflamatórios com diferenças não significativas ($p>0,05\%$), indicando a participação indistinta dos mediadores químicos pró-inflamatórios, nos três períodos experimentais. Portanto, para esse modelo experimental a divisão em fases é errônea, confirmando a afirmação de CATANZARO-GUIMARÃES²⁷ (1982), de que sob certas condições experimentais, em função da intensidade do agente flogógeno, poderia haver a sobreposição das diferentes fases do processo inflamatório agudo.

O extravasamento protélico em relação ao modelo induzido pela carragenina (TABELA 3, pág. 100), também, apresentou característica distinta, pois foi crescente no decorrer de todo o experimento, conforme pode ser demonstrado pela diferença estatisticamente significativa no período compreendido entre 1 e 6 horas ($P<0,05\%$). Esse resultado, indicou que os fármacos testados, no decorrer do tempo, perderam parte da potência antiinflamatória, particularmente, após 3 horas (TABELA 3, 4). Contudo, quando analisamos individualmente o efeito inibitório desses fármacos, verificamos que a dexametasona e o metotrexato apresentaram aumento da potência naquele período (GRÁFICO V), pág. 109.

Pela análise desse mesmo gráfico, e considerando o efeito inibitório mais acentuado apresentado pelo fármaco antiinflamatório não esteróide (Indometacina) e esteróides (dexametasona), comparativamente, ao fármaco citostático (metotrexato), concluímos que no tratamento da fase aguda dos processos de natureza inflamatória, onde haja acentuada produção das prostaglandinas, dos leucotrienos e de outros agentes quimiotáticos para neutrófilos, como os induzidos pela placa microbiana dental, os fármacos antiinflamatórios esteróides e não esteróides se apresentaram mais potentes comparativamente ao medicamento citostático.

6.1.3. MODELO EXPERIMENTAL INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR PARACOCCIDIOIDINA E SOLUÇÃO SALINA (0,9%)

A diferença estatisticamente não significativa entre os períodos experimentais ($p>0,05$) indica que esse agente apresenta estimulação flogística semelhante a da placa microbiana dental, diferindo dessa em relação à potência (tabela 4, pág. 101). Esse resultado sugere que os diferentes mediadores químicos participaram tanto da fase imediata como da fase tardia da permeabilidade vascular. Assim sendo, a decomposição em fases distintas de permeabilidade vascular, segundo o tipo de mediador químico atuante, a exemplo do que ocorreu com a placa microbiana dental, é mister reconhecer, inadequada.

Quando comparamos o efeito antiinflamatório dos fármacos testados nos modelos da placa microbiana dental e da paracoccidioidina, verificamos a diminuição do efeito antiinflamatório da indometacina, do tenoxicam e da dexametasona, no período experimental de 1 hora, sugerindo que esse agente induza uma estimulação flogógena menos intensa, causando menor destruição tecidual e menor síntese e secreção dos produtos resultantes do metabolismo do ácido araquidônico (GRÁFICOS V, VI, pág. 110).

Nesse período experimental, a semelhança da potência entre os inibidores da síntese das prostaglandinas (indometacina e tenoxicam) e o metotrexato indica que além das PGs e LTs, contrariamente ao que ocorreu no modelo induzido pela PMD, também, há a acentuada liberação dos produtos resultantes da ativação dos sistemas do complemento, da coagulação, das clíninas e de outras citocinas vasoativas produzidas pelas próprias células endoteliais e plaquetas, passíveis de serem inibidas pelo metotrexato (GRÁFICO VI), bem como bloqueando a resposta imunológica ao GP43.

O efeito apresentado pela dexametasona, semelhantemente ao efeito apresentado no modelo induzido pela PMD, indica a participação de LTs e de outras citocinas vasoativas, dentre as quais: a IL-8, PAF, PF-4, substância P, endotellina-3, TNF, IL-1, PDGF e EVGF, possivelmente, inibidas pela dexametasona já no período experimental de 1 hora, porém, em menor quantidade do que no modelo da PMD.

Em três horas, quando comparamos o efeito apresentado pelos fármacos antiinflamatórios não esteróides tenoxicam e indometacina entre si e no modelo experimental da PMD, também, constatamos diferenças. A indometacina em ambos os modelos (PMD e PCD) apresentou efeito semelhante e discretamente decrescente, enquanto que o tenoxicam aumentou a potência inibitória no modelo induzido pela paracoccidioidina (gráficos VI e V). Portanto, cabe-nos discutir as razões do aumento da potência apresentadas pelo tenoxicam.

A hipótese que nos parece mais coerente é que esse efeito decorre da maior inibição dos mecanismos inflamatórios gerados pela liberação do oxigênio livre no local da inflamação, lesivos à parede endotelial, mais intensamente inibidos por aquele medicamento. Relacionado a esse efeito é possível que a diminuição do oxigênio no local da inflamação estimule a maior produção da citocina vasoconstritora ET-1, cujo efeito é potencializado em decorrência da inibição da síntese de PGs. Esse mecanismo, possivelmente, justifica o efeito mais acentuado apresentado pelo tenoxicam em relação à indometacina nesse período experimental, também reduzindo o nível de nitrito e de ON.

Por outro lado, a acentuada potência apresentada pela indometacina entre 3 e 6 horas, nos modelos da PMD e da PCD, possivelmente, pode ser explicada tanto pela inibição das PGs como pela redução da quimiotaxia dos neutrófilos, decorrente da inibição dos fatores quimiotácticos como PAF; substância P e IL-8 (SACEDORTE & PANERAI¹⁹⁶, 1994); aumento da concentração local de histamina (HIRASAWA et al.⁹⁸, 1992); redução das enzimas lisossomais; e pela inibição da produção do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), do fator estimulador da colônia macrofágico-granulocítico (GM-CSF).

Em 6 horas (GRÁFICO VI, pág. 110), a exemplo do que ocorreu com o modelo induzido pela PMD, os fármacos mais potentes foram a indometacina e a dexametasona. Considerando que a dexametasona bloqueia a produção da CINC, estruturalmente semelhante a IL-8, a semelhança do efeito apresentado pela indometacina, sugere-nos que esse último fármaco, possa, igualmente, inibir a potente citocina quimiotática para neutrófilos dos ratos (CINC), reduzindo a migração e a ativação dos neutrófilos no local da inflamação.

O efeito mais acentuado apresentado pela indometacina, nesse período experimental, comparativamente ao do tenoxicam, nos três modelos experimentais, sinaliza que a indometacina pode reduzir mais acentuadamente os fatores quimiotáticos para neutrófilos. Em outras palavras, o tenoxicam praticamente não apresenta efeito inibitório da quimiotaxia de neutrófilos, no período de 6 horas. Portanto, resta-nos, questionar se após esse período experimental a indometacina mantém o efeito inibitório inicial e/ou se o tenoxicam aumenta a potência com o decorrer do tempo. Essas dúvidas serão melhor elucidadas, quando da análise histomorfométrica relativa da região central de necrose supurativa dos granulomas aos 7 dias.

Uma outra possibilidade é que o tenoxicam por reduzir mais acentuadamente o oxigênio livre e a síntese de prostaglandinas potencialize o efeito vasoconstritor das endotelinas ET-1 e ET-3, produzindo hipóxia tecidual, que por sua vez estimula a produção da óxido nítrico sintetase (ONs), cujo produto o óxido nítrico causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

Quando comparamos o efeito dos fármacos antiinflamatórios não esteróides com o efeito dos antiinflamatórios esteróides e da droga citostática, verificamos que as três famílias de medicamentos apresentaram considerável efeito antiinflamatório no decorrer do experimento (GRÁFICO VI). Possivelmente, o elo de ligação entre o efeito antiinflamatório apresentado pelos medicamentos testados seja a inibição dos mecanismos inflamatórios ativadores da síntese das prostaglandinas e dos leucotrienos, bem como de outros mecanismos diretamente relacionados à produção dessas citocinas.

Considerando o efeito antiinflamatório mais acentuado apresentado pelos fármacos antiinflamatórios não esteróides e esteróides, bem como os seus efeitos colaterais menos intensos, comparativamente ao do medicamento citostático, sugerimos

no tratamento da fase aguda dos processos inflamatórios induzidos por agentes flogógenos de baixa intensidade semelhantes à paracocidioídina, o emprego dos fármacos antiinflamatórios não esteróides, por bloquear a imunodepressão via PGs.

6.2. EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO CRÔNICO

6.2.1. ANÁLISE MORFOMÉTRICA RELATIVA

6.2.1.1. GRUPO CONTOLE

Com base na análise morfométrica realizada em função do tempo, os resultados constantes nas tabelas 6, 7 e 8 demonstraram, por meio do emprego dos teste de Friedmann e das comparações múltiplas, diferença estatisticamente não significativa ($P>0.05$), em relação à densidade de volume ocupada pelo tecido granulomatoso, indicando que não houve alteração da densidade do volume dessa região no decorrer do tempo.

Portanto, é possível que somente tenha ocorrido a substituição dos componentes exsudativo e angioblástico do tecido de granulação, presente nos primeiros 7 dias, e inicialmente volumosos, pelos componentes celulares e fibrosos do tecido granulomatoso, constatado após esse período experimental, sem alterar a sua densidade de volume.

Confirmado essa suposição, a análise estatística da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), com exceção do período compreendido entre 7 e 14 dias, nos demais períodos a diferença foi considerada estatisticamente significativa ($p<0.05\%$), indicando o aumento da densidade do volume dessas células no decorrer do tempo (TABELAS 6, 8; GRÁFICO XIV, págs. 103, 106, 107 e 114).

Outro dado que está em consonância com a hipótese de que ocorra a substituição dos componente edematoso do tecido de granulação pelos componentes celulares, vasculares e fibrosos do tecido granulomatoso sem alterar a densidade de volume desse tecido, é o fato de que a densidade de volume ocupada pelas fibras colágenas e macrófagos no período compreendido entre 7 e 28 dias, aumentou (TABELAS 6, 8; GRÁFICO XIII, pág. 114), enquanto que a densidade de volume ocupada pela região central de necrose supurativa e o peso diferencial indicativo do exsudato inflamatório diminuíram (TABELAS 6, 8; GRÁFICOS IX, XV, págs. 112 e 115).

A propósito dessa hipótese, ainda, dispomos de alguns dados obtidos pelo nosso estudo microscópico descritivo, que estão em consonância com ela, pois apontaram o discreto aumento da angiogênese dos granulomas, no período compreendido entre 7 e 21 dias, onde constatamos, predominantemente, o acentuado número de brotos capilares e vasos de pequeno calibre, que, após esse período, diminuíram em número, porém aumentaram em tamanho, produzindo considerável aumento da densidade do

volume por eles ocupada. A queda do peso diferencial apresentado pelos granulomas do grupo controle, durante todo o experimento, igualmente, sugere a diminuição do componente exsudativo do tecido granulomatoso (GRAFICO XI, pág. 113).

Essas observações coincidem com a microscopia das lesões dérmicas induzidas pela parede celular de estreptococcus relatadas por PAGE; DAVIES; ALLISON^{168, 169} (1974). Entretanto, para confirmarmos integralmente os resultados obtidos por nossa análise microscópica, ainda, é necessário em futuros trabalhos, analisar-se histomorfometricamente a densidade do volume ocupada pelo edema, vasos sanguíneos, linfáticos e demais componentes celulares presentes no granuloma.

O aumento da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e das fibras colágenas, bem como a diminuição da área central de necrose, constatada durante todo o experimento (TABELAS 6 e 8; GRÁFICO XIII, XIV, XVI), págs. 103, 106, 114 e 115, está em consonância com a afirmação de CATANZARO-GUILMARAES²⁷ (1982) a respeito da origem das lesões granulomatosas e do papel central dos macrófagos na patogênese dessas lesões. Segundo o autor, quando o estímulo flogógeno induz acentuada destruição tecidual, são gerados抗ígenos capazes de estimular a produção de anticorpos e formar imunocomplexos indutores da produção de mediadores quimiotácticos promotores da migração e da ativação celular no local da inflamação.

Em decorrência desses eventos, também, são gerados vários produtos biologicamente ativos (IL-1, TNF, substância P, IL-8, CINC) estimuladores do contínuo fluxo celular para o local da inflamação. Tais mediadores, inicialmente, induzem a formação de um tecido edematoso rico em neutrófilos, células endoteliais e vasos sanguíneos capazes de estimular o contínuo fluxo de macrófagos. Em decorrência da ativação dessas células, ao nível do foco inflamatório, são gerados outros produtos biologicamente ativos, igualmente, quimiotácticos e mitogênicos para fibroblastos e células endoteliais, bem como ativadores dessas células à síntese de novas fibras colágenas.

Dentre esses produtos, destacam-se os fatores de crescimento, que além de serem angiogênicos e aumentarem a quimiotaxia de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e fibroblastos, elevam a atividade fagocitária dos macrófagos e neutrófilos, causando a liberação de enzimas lisossomais para o meio extracelular. São, igualmente, capazes de estimular ou desreprimir genes ativadores ou repressores da transcrição das proteinases, aumentando a destruição tecidual (MEGHJI¹⁵⁰, 1992).

Microscopicamente, em cortes corados pelo tricrômico de Mallory a destruição do componente colagênico pode ser identificada tanto pela área central de necrose supurativa como pela decomposição das fibras colágenas presentes no tecido granulomatoso, que perderam o seu aspecto basofílico característico, adquirindo a aparência difusa, apresentando de perrelo pequenas estruturas fibrilares fortemente coradas pelo tricrômico, indicadoras do início da formação de novas fibras.

Com o passar do tempo, concomitante e gradualmente com a diminuição da destruição tecidual, esses fatores de crescimento ao se ligarem aos receptores de membrana do tipo Integrina, geram mensageiros secundários solúveis capazes de estimular a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em fibroblastos, e a subsequente produção da matriz intercelular.

Em relação a esse último processo, alguns dos fatores de crescimento, tais como IGF-1, TGF- β e o EGF estimulam à síntese de mucopolissacarídeos, que por sua capacidade de atrair íons, são importantes na organização das fibras colágenas constituintes do tecido granulomatoso, orientando o seu crescimento. Além do mais, os glicoaminoglicanas e proteoglicanas aumentam a estabilidade térmica e protegem contra a destruição colagenolítica.

No presente trabalho, em relação à densidade do volume da região central de necrose, foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre os períodos de 7 e 28 dias, indicando a diminuição gradual e a sua substituição, com o passar do tempo, por tecido granulomatoso (TABELAS 6 e 8). Esse achado confirma a afirmação de CATANZARO-GUIMARÃES²⁷ (1982), segundo a qual, o processo necrótico inicial estimularia a formação de tecido granulomatoso, que, posteriormente, amadurece aumentando a colagenização. Nesse particular, devemos ressaltar a importância da destruição tecidual como fonte geradora dos抗ígenos ativadores das reações da hipersensibilidade do tipo imediato e tardio, capazes de produzirem linfocinas estimuladoras da migração dos macrófagos e linfócitos, bem como da sua ativação no foco inflamatório crônico.

Pela análise microscópica descritiva, também, foi constatada a presença, em grau acentuado, de um material granular eosinófilo de aspecto fibrinóide no interior da região central do granuloma e de permeio aos componentes celulares e fibrosos do tecido granulomatoso, que com o passar do tempo, em ambas as regiões, diminuiu. A presença desse material pode ser explicado, segundo CATANZARO-GUIMARÃES²⁷ (1982), como decorrente de alterações no endotélio vascular que possibilitam a passagem de macromoléculas para o ambiente intersticial e deste para o foco inflamatório.

A sua presença, conjuntamente com a do ácido hialurônico, fibronectina, glicoamonoglicanas e proteoglicanas, forma uma matriz necessária à proliferação, migração e diferenciação celular, bem como a síntese do colágeno. Além do mais, vários produtos resultantes da fragmentação dos seus componentes, como o hialuronidato, estão diretamente relacionados com o aumento da quimiotaxia, migração, aderência e fagocitose dos polimorfonucleares neutrófilos. Tal efeito parece depender da ligação do hialuronidato aos receptores de membrana dessas células, por meio de um mecanismo dependente da ação da fibronectina (NORTON & BURSTONE¹⁶⁰, 1989).

Conjuntamente com a formação do material fibrinóide são gerados peptídeos com acentuada potência quimiotáctica, como o fibrinopeptídeo B (hFpB) cuja potência em relação à migração dos macrófagos e neutrófilos é semelhante ao das anafilatoxinas

produzidas em decorrência da ativação do complemento, do LTB₄ e da formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), enquanto que em relação à quimiotaxia de fibroblastos apresenta atividade comparável a do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). O mecanismo envolvido na sua atividade quimiotática, possivelmente, deve-se ao aumento da actina presente no citoesqueleto, não ocorrendo à sua ligação aos receptores para C5a, LTB₄ ou fMLP, nem causando a secreção das enzimas lisossomais ou a produção do anion superóxido (SENIOR et al. 208, 1986).

Contudo, a presença em excesso dos componentes da matriz extracelular pode inibir a formação do granuloma, visto que a alta concentração de fibrina impede a penetração dos macrófagos no tecido de granulação e consequentemente a formação do tecido granulomatoso. Igualmente, a alta concentração de ácido hialurônico tem sido associada a inibição da vascularização desse tecido. Além do que, inibe a aderência e a locomoção dos polimorfonucleares neutrófilos (NORTON & BURSTONE¹⁶⁰, 1989). Portanto, os granulomas inflamatórios são, igualmente, influenciados tanto pela formação como pela degradação dos diferentes componentes da matriz extracelular.

A propósito disso, foi demonstrado que a baixa concentração de fibrina fornece um bom substrato para a migração dos macrófagos, enquanto que a alta concentração impede a migração dessas células. A degradação do ácido hialurônico também é necessária para vascularização dos granulomas, visto que os produtos da degradação do hialuronato de sódio apresentam potencial angiogênico.

A diminuição gradual da região central do granuloma, bem como do material granular eosinófilo presente, em grande quantidade no tecido granulomatoso, aos 7 dias, possivelmente, seja decorrente da fragmentação da matriz extracelular, no decorrer do tempo, originando produtos como C3a e polipeptídeos, que têm sido associados ao aumento da vascularização, da permeabilidade vascular e da transmigração dos eosinófilos, neutrófilos e monócitos, desempenhando, portanto, papel importante no início do processo inflamatório crônico granulomatoso.

6.2.1.2. GRUPOS MEDICADOS

6.2.1.2.1. TENOXICAM

A análise estatística do efeito antigranuloma comparativa entre os grupos é apresentada na tabela 7. A diferença estatisticamente significativa ($P<0,05\%$), aos 7 dias, entre a densidade do volume da região central dos granulomas no grupo medicado, comparativamente ao controle, indicou que o tenoxicam produziu a diminuição da densidade do volume dessa região, que, possivelmente, possa ser explicada com base na inibição da migração dos neutrófilos pela ligação do fármaco aos receptores para substâncias quimiotáticas, bloqueando-os e impedindo a secreção da IL-1 pelos

neutrófilos (SCHEINBERG; SANTORO; SANCHES²⁰², 1990). Esse resultado, também, está em consonância com o trabalho de HASCELIK et al.⁸⁸ (1994), que ao estudarem *In vitro* a quimiotaxia dos neutrófilos obtidos de pacientes portadores de artrite reumatóide e tratados com o tenoxicam, constataram, aos 7 dias, a redução da migração daquelas células comparativamente ao grupo controle.

A diferença estatisticamente significativa entre os grupos indometacina e tenoxicam e não significativa entre os grupos tenoxicam, dexametasona e metotrexato, indicou, em relação à inibição da densidade de volume da região de necrose supurativa, potência superior a da indometacina e semelhante a da dexametasona e a do metotrexato. Em outras palavras, no período experimental de 7 dias, o tenoxicam, comparativamente a indometacina, inibiu mais intensamente a migração celular para a região central de necrose supurativa (TABELAS, 6, 7, GRÁFICO XVI, pág. 103, 104, 105 e 115). Esse resultado associado ao do teste edemogênico, que, às 6 horas, indicou a maior potência antiinflamatória da indometacina, igualmente, sugere, no período compreendido entre 6 horas e 7 dias, a diminuição da potência inibidora da quimiotaxia dos neutrófilos por esse fármaco.

Tal resultado, igualmente, indicou que o tenoxicam apresenta, comparativamente à indometacina, maior efeito estabilizador da membrana lisossomal dos neutrófilos. Portanto, está em consonância com a afirmação de DOWES; ROBIN; STENDLE⁵² (1975), segundo a qual, alguns dos antiinflamatórios não esteróides, quando administrados em baixa concentração, a semelhança do que ocorre com altas doses corticosteróides, estabilizariam a membrana lisossomal dos neutrófilos, diminuindo a secreção das enzimas lisossomais, reduzindo, consequentemente, a destruição tecidual, a geração dos fatores quimiotáticos e a densidade do volume da região central de necrose supurativa. Também não devemos omitir a influência do tempo de administração em relação à obtenção desse efeito. (TABELAS 6 e 7).

Considerando que no período experimental de 7 dias não houve diferença estatística significante entre o efeito do tenoxicam e dexametasona, em relação a inibição da densidade de volume da região central, é possível, que o tenoxicam além da inibição da síntese de prostaglandinas, também, bloqueie a geração de outras citocinas estimuladoras da quimiotaxia, dentre as quais destacamos a inibição dos produtos resultantes da degradação da fibrina decorrentes da fibrinólise, pois o tenoxicam ao ligar-se aos receptores para uroquinase ativadores do plasminogênio, pode inibir o sistema fibrinolítico, fonte geradora dos potentes peptídeos quimiotáticos (KIRCHHEIMER¹¹⁸, 1993).

Também pode causar a bloqueio dos receptores da membrana celular dos neutrófilos para C3b e FC das partículas opsonizadas (SCHEINBERG; SANTORO; SANCHES²⁰², 1990) impedindo a fagocitose por essas células e reduzindo a liberação das enzimas lisossomais, com a consequente inibição da geração dos potentes agentes quimiotáticos produzidos em decorrência da ativação dos sistemas do complemento, fibrinolítico e da coagulação, por proteínas teciduais alteradas pela atividade enzimática lisossomal ao nível do foco inflamatório.

A inibição da síntese das citocinas IL-1 e TNF- α e da proteína (α -trombina), a elas relacionada, capazes de aumentar a produção das moléculas de adesão celular (ICAN-I, selectina E) e de contrair o citoesqueleto das células endoteliais aumentando a transmigração celular, pode ser outro mecanismo envolvido na redução da migração celular para a área central de necrose supurativa. (TATAKIS²³⁰, 1993).

Além do mais, o efeito antioxidante apresentado pelo tenoxicam bloqueando o oxigênio liberado no local da inflamação, evitando, por conseguinte, a formação dos radicais livres derivados desse elemento, pode, indiretamente, contribuir para a redução da migração dos neutrófilos, pois promove a redução da agressão à parede vascular, a diminuição da permeabilidade vascular e a ativação das antiproteases, reduzindo, consequentemente, a exsudação plasmática, a destruição tecidual e a geração dos fatores quimiotácticos.

Por outro lado, sabe-se que a hipoxia tecidual, ou seja, a baixa tensão do oxigênio estimula a angiogênese, visto que promove o aumento da produção do fator do crescimento endotelial vascular (EVGF) (FRANK⁷², 1994). Além desse mecanismo, é necessário ressaltarmos que a diminuição da tensão do oxigênio, também, está diretamente relacionada à regulação da ativação do sistema enzimático xantina dehidrogenase/xantina oxidase nas células endoteliais, uma vez que aumenta a produção do RNAm e a transcrição da informação genética necessária à produção da XD/XO (HASSOUN et al.⁹⁰ 1994).

Com base no aumento da produção das várias citocinas angiogênicas promovidas pela hipoxia tecidual, entendemos que um dos mecanismos envolvidos na produção dos fatores de crescimento (PDGF, EVGF) e endotelinas pelas células endoteliais, necessário à neoformação vascular seja os produtos derivados da ativação do sistema enzimático XD/XO. Portanto, fármacos antiinflamatórios não esteróides como o tenoxicam, potente redutor do oxigênio livre presente no local da inflamação, comparativamente a outros antiinflamatórios não esteróides, como a indometacina capaz de estimular a formação do anion superóxido, possivelmente, por baixarem a tensão do oxigênio, podem ativar o sistema enzimático da XD/XO estimulando à angiogênese. Essa hipótese foi confirmada, indiretamente, no presente trabalho, uma vez que a nossa análise microscópica descritiva indicou, no período experimental de 7 dias, o aparente e estimulo da neoformação vascular pelo tenoxicam, contrariamente ao proporcionado pela indometacina, que a inibiu.

Tomando por base esse efeito, cabe-nos, discutir os principais mecanismos envolvidos no efeito antioxidante responsável pela diminuição da tensão do oxigênio e do aumento da angiogênese.

Como o tenoxicam ao ligar-se não competitivamente aos receptores para o N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) apresenta efeito inibidor da produção do anion superóxido (O_2^-) por neutrófilos (COLLI et al.³⁴ 1991), entendemos que esse fármaco por reduzir o oxigênio livre presente no local da inflamação, pode estimular o sistema XD/XO induzindo à transformação da xantina em hipoxantina e essa em ácido úrico, que, como

sabemos, é um produto do metabolismo das purinas com acentuada atividade antioxidante dos radicais livres solúveis em água.

Os nossos resultados estão em consonância com esse mecanismo, visto que nos primeiros 7 dias o tenoxicam estimulou a angiogênese, Inibindo-a logo a seguir. Possivelmente, esse efeito seja particularmente importante nos primeiros 7 dias, quando a população celular dos neutrófilos presente no tecido granulomatoso, ainda, é bastante numerosa.

Outro mecanismo, possivelmente, envolvido na redução da migração celular pelo tenoxicam é a inibição do neuropeptídeo (substância P) e da Interleucina 8, que além de estimularem a quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos (SACERDOTE & PONERAI¹⁹⁶, 1994), também, são potentes agentes vasodilatadores e mitogênicos para as células endoteliais (FOREMAN & JORDAN⁷⁰, 1983).

Recentemente, foi demonstrado que o tenoxicam ao reduzir a produção da substância P e da IL-8, em decorrência da diminuição da proliferação das células endoteliais, poderia, indiretamente, reduzir a produção da IL-1, dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF), do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e do fator 4 plaquetário (PF-4), também, potentes agentes quimiotácticos para neutrófilos (HOLM & MAISEL¹⁰⁰, 1992; ROTHE & FALANGA¹⁹³, 1992; SACERDOTE & PANERAI¹⁹⁶, 1994). Os nossos resultados vêm ao encontro desses mecanismos, visto que identificamos durante o experimento a redução do trânsito celular na região central do granuloma.

Associado a esse efeito lembramos que essas citocinas (PDGF; FGF), também, são potentes estimuladores da produção do fator de crescimento vascular endotelial (EVGF) e da angiogênese (NICOSIA; NICOSIA; SMITH¹⁵⁹, 1994). Portanto, tais mecanismos confirmam os resultados da nossa análise microscópica descritiva, a qual, após 7 dias, apontou o decréscimo da vascularização dos granulomas no grupo medicado com o tenoxicam comparativamente ao grupo controle. Entretanto, mais uma vez, ressaltamos a importância da realização de futuros estudos histomorfométricos para constatação dessa observação.

O mecanismo inibidor da ciclooxygenase apresentado pelo tenoxicam, assim como o possível efeito quelante dos íons essenciais, teoricamente, bloqueador do funcionamento dos sistemas enzimáticos relacionados à fosforilação oxidativa, que é fonte de energia (ATP) para a migração, proteólise e fagocitose realizada pelos neutrófilos e macrófagos é uma outra possibilidade. Como consequência desse efeito, pode ocorrer a redução da produção e da secreção das prostaglandinas, das enzimas lisossomais e a diminuição do dano tecidual, resultando em uma menor produção dos radicais livres e dos agentes quimiotácticos.

Outro resultado interessante foi o efeito relativo ao estímulo da neoformação vascular apresentado pelo tenoxicam contrário ao apresentado pela Indometacina e semelhante ao da dexametasona. Esse resultado sugere-nos que o tenoxicam apresenta

efeito antioxidante inicial mais potente do que a indometacina. Os mecanismos responsáveis por esse efeito, ainda, serão discutidos quando da análise histomorfométrica relativa do grupo medicado com dexametasona.

Considerando que a dexametasona é um potente inibidor da citocina quimiotática para neutrófilos (CINC), produzida no rato semelhante a IL-8 produzida em humanos, e, que, o efeito redutor da região central apresentado pelo tenoxicam aos 7 dias, foi semelhante ao da dexametasona (GRÁFICOS XX, XVI, págs. 115 e 117); entendemos, que, em parte, a diminuição da densidade do volume da região central causada pelo tenoxicam pode ter sido causada pela inibição daquela citocina. O mecanismo envolvido pode ser decorrente da inibição da produção de IL-1 pelo fármaco (SCHEIMBERG; SANTORO; SANCHES²⁰², 1990), visto que essa citocina, semelhantemente ao TNF, apresenta efeito estimulador da produção e secreção da IL-8, a qual entre outros efeitos, é capaz de estimular a produção do ânion superóxido (TSAI et al.²³⁸, 1994; KURIHARA et al.¹²⁷, 1994).

Após os 7 dias, o estudo da densidade de volume da região central em função do tempo (TABELA 8) indicou o aumento dessa região, conforme pode ser constatado pela diferença estatisticamente significativa ($p<0.05\%$) entre os períodos de 7 e 21 dias. Não obstante, comparativamente ao grupo controle, apresentar-se com o número de células em trânsito por essa região diminuído. Também constatamos o aumento do material eosinófilo fibrinóide presente no interior dessa região.

Podemos explicar o aumento da região central de necrose, possivelmente, como decorrente do acentuado efeito apresentado pelo fármaco aos 7 dias reduzindo migração de neutrófilos e, após esse período, pela diminuição da densidade de volume de macrófagos (NM/F), bem como da secreção dos seus produtos quimiotáticos, reduzindo o trânsito celular por essa região e a consequente fragmentação do material fibrinóide (fibrinólise), determinando o aumento da quantidade desse material na região central do granuloma (GRÁFICO XVI, pág. 115). Além desse mecanismo, o suposto efeito redutor da síntese de IL-1, causando o bloqueio da proteína quinase impede a produção do ativador do plasminogênio (PA-t); aumenta a produção do inibidor do ativador do plasminogênio (PA-I); bem como, o mecanismo bloqueador dos receptores tipo uroquinase, inibindo a fibrinólise, certamente contribuiu para esse efeito.

Em consonância com esses mecanismos citamos os resultados do nosso estudo histomorfométrico e da nossa análise microscópica descritiva que apontaram o maior aumento dessa região aos 21 dias, coincidindo com o período experimental de maior inibição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) e da vascularização (TABELA 6; GRÁFICOS XIV, XVI, pág. 106 e 114).

Quanto ao tecido granulomatoso, o tenoxicam, até 21 dias, produziu a diminuição da densidade do volume desse tecido, comparativamente ao grupo controle, conforme pode ser constatado pela diferença estatisticamente significativa ($p<0,05\%$) entre os períodos de 7 e 21 dias (TABELA 8, págs. 106 e 107). Com base nesse resultado verificamos que o tenoxicam apresentou efeito inibidor crescente, que, posteriormente,

manteve-se constante até 28 dias (GRÁFICO XIX, pág. 117), conforme demonstrou a diferença estatisticamente não significativa entre os períodos de 21 e 28 dias (TABELA 8, pág. 106 e 107).

A análise da tabela 7, também, evidenciou que o tenoxicam, com exceção do período dos 14 dias, com potência inferior a da indometacina ($p < 0,05$), nos demais períodos, inibiu o tecido granulomatoso ($p > 0,05$). Possivelmente, esse último efeito possa ser explicado pela menor inibição da densidade do volume das fibras colágenas (entre 21 e 28 dias) e da vascularização desse tecido (TABELA 7, pág. 105 e 106). Após aos 21 dias perdeu parte do efeito inibitório da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) e da vascularização, de maneira que diminuiu a densidade de volume do tecido granulomatoso com diferença não significativa ($p > 0,05$) para a indometacina.

Aos 28 dias, o efeito inibidor do tecido granulomatoso apresentado pelo tenoxicam foi superior ao apresentado pelo metotexato e dexametasona, segundo pode ser constatado pela diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (GRÁFICOS XV, XIX, págs. 115 e 117). Tal efeito, igualmente, pode ser atribuído ao efeito mais potente apresentado pelo tenoxicam em relação à inibição da vascularização.

Considerando que o efeito antigranuloma do tenoxicam, deveu-se, em parte, à redução da formação do tecido granulomatoso, resta-nos analisar quais componentes desse tecido foram inibidos com maior intensidade pelo fármaco.

Durante todo o experimento inibiu a densidade do volume dos macrófagos (NM/F), conforme indicou a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o grupo controle (TABELAS 7 e 8, págs. 105, 106, 107 e 108). Contudo, o seu efeito foi mais acentuado a partir dos 14 dias (TABELAS 7 e 8; XVIII, pág. 111). Esses resultados confirmam o trabalho de SCHEINBERG; SANTORO; SANCHES.²⁰² (1990), segundo o qual, a inibição da quimiotaxia dos monócitos pelo tenoxicam ocorreu após 14 dias, conforme foi demonstrado pela diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) após aquele período.

Dentre os possíveis mecanismos de ação do tenoxicam envolvidos na diminuição da densidade de volume de macrofágos (NM/F), além da inibição dos mecanismos relacionados à quimiotaxia já relatados, merece destaque a análise mais acurada: a influência que a inibição da síntese das prostaglandinas pelo tenoxicam exerce na concentração dos nucleotídeos cíclicos, bem como na proliferação e diferenciação das células mieloides progenitoras dos monócitos em macrófagos.

Em relação a esse último efeito os resultados são controvertidos, admitindo-se que a ação desses prostanóides seja dependente da estrutura molecular, da dose e do modelo experimental empregado.

Em alguns sistemas celulares as PGs ao ativarem a adenilciclase aumentam o nível intracelular do AMPc inibindo a proliferação celular, devido à manutenção do estado de diferenciação. Portanto, a inibição desses prostanóides pelos inibidores da ciclooxigenase, como o tenoxicam causaria efeito proliferativo.

Em consonância com essa hipótese, estudos empregando fármacos antiinflamatórios não esteróides (Indometacina) e esteróides (dexametasona) demonstraram o efeito estimulador da proliferação celular apresentado pelos medicamentos bloqueadores da ciclooxygenase (FAVALLI et al.⁶³, 1980).

No presente trabalho, a redução da densidade do volume de macrófagos (NM/F) contraria esses estudos, sugerindo que o tenoxicam apresenta em relação às células mieloides precursoras dos monócitos/macrófagos efeito antiproliferativo, estando de acordo com os trabalhos que atribuem as prostaglandinas efeito proliferativo.

Nessas células, possivelmente, as prostaglandinas ao se ligarem aos seus receptores ativam a proteína G, conjuntamente com a adenilciclase, produzindo mensageiros secundários necessários à ativação da proteína quinase C e a fosforilação das proteínas intranucleares que funcionam como fatores de transcrição capazes de ativar ao nível do DNA genes responsáveis pela proliferação celular.

Entretanto, em relação às células endoteliais, os resultados da nossa análise microscópica descritiva indicaram que os antiinflamatórios não esteróides como o tenoxicam apresentaram efeitos tanto estimuladores como inibidores da proliferação celular dependentes do tempo de administração.

Tais resultados demonstraram, aos 7 dias, efeito estimulador da proliferação das células endoteliais, que foi gradativamente decrescendo até o período experimental dos 14 dias, quando então, apresentou o efeito inibitório da vascularização. Esse efeito se acentuou no período de 21 dias, após o qual, perdeu parte da potência inibitória dessa estrutura. Salientamos, novamente, a importância da realização dos estudos histomorfométricos e o posterior o tratamento estatístico dos resultados para a confirmação da nossa análise descritiva.

Além desse mecanismo é possível que o efeito redutor da vascularização apresentado pelo tenoxicam, também, seja decorrente da inibição dos fatores de crescimento angiogênicos tais como: FGF, PDGF, IGF produzidos pela população de macrófagos (NM/F), que, particularmente, aos 21 dias tiveram a densidade do volume acentuadamente diminuída pelo tenoxicam. Ressaltamos, ainda, que algumas dessas citocinas, igualmente, são capazes de estimular a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

A redução mais acentuada da densidade de volume de macrófagos (NM/F) e da vascularização, constatada no período experimental entre os 14 e 28 dias, em relação ao grupo controle (TABELAS 6, 7 e 8; GRÁFICO XIV, 103, 104, 105, 106, 107 e 108), associada a redução da densidade de volume das fibras colágenas (GRÁFICO XIII, 114), verificada após 21 dias, está em consonância com a hipótese de DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN⁴⁸ (1982), segundo a qual, os macrófagos produziriam vários produtos biologicamente ativos capazes de modular a quimiotaxia, a proliferação e a síntese de colágeno pelos fibroblastos e células endoteliais.

Com relação à síntese das fibras colágenas, verificamos que o tenoxicam produziu o aumento da sua densidade de volume até 14 dias, com diferença não significativa para o grupo controle (TABELAS 6, 7 e 8). Aos 21 dias, o fármaco, a despeito da inibição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), aumentou a densidade de volume das fibras colágenas, apresentando potência semelhante a da indometacina. Aos 28 dias (TABELAS 6, 7 e 8, págs. 103, 104, 105, 106 e 107), produziu efeito semelhante ao da indometacina, diminuindo a densidade do volume das referidas fibras (GRÁFICO X, pág. 112).

Esse efeito dual apresentado pelo tenoxicam, possivelmente, pode ser explicado com base no efeito dependente da concentração e do tempo de administração. Em outras palavras, é possível que o tenoxicam quando administrado na concentração terapêutica convencional (20 mg/dia) até o período experimental de 21 dias estimule a produção das fibras colágenas, enquanto que a administração por períodos superiores a 21 dias iniba a produção dessas fibras. Portanto, a diminuição da concentração das PGs no foco inflamatório no decorrer do experimento estimulou a produção de fibras colágenas, sugerindo que a concentração elevada de PGs inibe a sua produção. Tal resultado vem ao encontro do trabalho de JHONSSON & PASTAN¹⁰⁹ (1971), segundo o qual, as prostaglandinas inibiam a proliferação dos fibroblastos. Outrossim, o fato de ter ocorrido a inibição da síntese das fibras colágenas após 21 dias, indica que a ausência ou a presença mínima de PGs, inibe a produção das fibras colágenas.

Esse resultado, também, confirmou os trabalhos *In vitro* realizados por DAVIDOVITH & SHANFELD⁴¹, 1980; CHYUN & RAJSZ³³, 1994), os quais demonstraram o efeito estimulador da síntese do colágeno pela PGE₂, quando presente em cultura por períodos prolongados. Possivelmente, esse efeito esteja relacionado com a produção da IL-1, que, como sabemos, é capaz tanto de estimular como de degradar colágeno.

Portanto, considerando, também, que alta concentração de PGs pode inibir a produção da IL-1, o efeito estimulador da síntese de fibras colágenas apresentado pelo tenoxicam, nos primeiros 21 dias, poderia ser atribuído ao aumento gradual da produção de IL-1 decorrente da gradual diminuição da concentração de PGs no foco inflamatório promovida pelo fármaco.

Considerando, ainda, que alta concentração das PGs apresenta efeito inibidor da mitogênese das células T, da citotocicidade mediada por células e da produção de anticorpos (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS¹⁶³, 1993), reduzindo, ao nível do foco inflamatório, a presença das citocinas produzidas pelos linfócitos T e B capazes de controlar a síntese da IL-1; é possível que a diminuição da concentração das PGs, proporcionada pelo tenoxicam, eleve a produção pelas células T das citocinas IFN-γ, TNF e IL-2, bem como de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 estimulando as células B à produção de anticorpos.

Portanto, a diminuição gradual das PGs e o aumento da produção do TNF pela ativação das células T auxiliares decorrente da diminuição da concentração de PGs

estimula a síntese da IL-1. Por outro lado, em decorrência da ativação tanto das células T como das células B são geradas outras citocinas (IL-4, INF- γ) capazes de reduzir a produção da IL-1, de maneira que a concentração dessa citocina aumenta lentamente.

Além do mais, como o aumento da síntese do colágeno coincidiu com o período de maior aumento do efeito inibitório da vascularização e da densidade de volume dos macrófagos (NM/F), é possível que o aumento da densidade de volume das fibras colágenas, também, esteja relacionada ao não bloqueio da produção pela população celular presente no granuloma dos fatores de crescimento (PDGF, IGF, FGF e TGF) estimuladores da síntese dessas fibras.

Por outro lado, a diminuição da densidade de volume das fibras colágenas constatada após 21 dias pode ser atribuída ao acentuado aumento da produção de IL-1 estimulada pela concentração mínima ou ausente de PGs, bem como pela diminuição do efeito inibidor da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e da vascularização apresentada pelo tenoxicam aos 28 dias.

Considerando que a reação enzimática de hidroxilação da prolina e da lisina pela enzima pró-colágeno-prolina-hidroxilase, necessária à produção das fibras colágenas, requer O_2 , Fe^{+2} , α -cetoglutarato e um agente redutor (o ácido ascórbico); a diminuição da densidade de volume estatisticamente significativa ($P<0.05\%$) para o grupo controle, em relação à densidade do volume das fibras colágenas constatada no período compreendido entre 21 e 28 dias (TABELA 6, 7, págs. 103, 104 e 105), em parte, também, pode ser atribuído ao efeito redutor da tensão do O_2 presente no local da inflamação, proporcionado pelo fármaco.

6.2.1.2.2. INDOMETACINA

Aos 7 dias, quando comparamos o efeito da indometacina em relação ao grupo controle, verificamos que esse medicamento agiu diminuindo a densidade do volume do tecido granulomatoso e aumentando a densidade de volume da região central de necrose, porém com diferença não significativa para o grupo controle (TABELA 6; GRÁFICOS XV, XVI, págs. 103 e 115).

Em relação à densidade do volume da região central, a diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) entre os grupos indometacina e tenoxicam, no período experimental de 7 dias, demonstrou a maior potência antiinflamatória do tenoxicam (TABELAS 6, 7; GRÁFICO XIII, págs. 103, 104, 105, 106, 107, 108 e 114). Provavelmente, esse efeito inibidor tenha explicação no fato de que o tenoxicam, a exemplo do que ocorreu no líquido sinovial, possa inibir mais acentuadamente as enzimas proteoglicanase e collagenase teciduais, inibindo mais acentuadamente a geração dos agentes quimiotáticos (GRÁFICO XVII, pág. 116) (WERB²⁵², 1978).

Outra explicação decorreria do efeito antioxidante mais potente apresentado pelo tenoxicam, anteriormente referido. Relacionado, ainda, a esse efeito, lembramos que a indometacina por não inibir a geração do ânion superóxido pode causar dano tecidual e a geração de mediadores quimiotáxicos para neutrófilos. Talvez esse mecanismo, igualmente, seja o responsável pelo efeito inibidor da angiogênese proporcionado pela indometacina, por inibir a proliferação das células endoteliais.

A não inibição da produção de IL-1 pela indometacina e, até mesmo, por estimular a produção do TNF, pode causar a ativação das proteinases neutras, do fator ativador do plasminogênio e das metaloproteinases latentes. Além do mais, as citocinas TNF e IL-1 não inibidas por esse fármaco, podem agir sinergicamente, por meio de um mecanismo que parece não ser mediado pela produção endógena de prostaglandinas, estimulando a secreção da IL-8 pelos macrófagos, fibroblastos e linfócitos; causando, consequentemente, a quimiotaxia celular para a região central do granuloma, aumentando a sua densidade de volume. Entretanto, no nosso estudo, o aumento dessa região proporcionada pelo fármaco, em relação ao grupo controle, foi considerada estatisticamente não significativa. ($p>0,05$) (TABELA 7, 105 e 106).

Outro mecanismo, possivelmente, envolvido na diminuição da densidade de volume dessa região é a não inibição da formação dos leucotrienos LC₄ e LD₄, capazes de ativar os macrófagos à liberação de enzimas lisossomais, que na dependência dos produtos da ciclooxigenase, ativam os linfócitos B e T gerando linfocinas, as quais, conjuntamente com o LTB₄, agem induzindo a quimiotaxia para a região central do granuloma (FEUERSTEIN; FOEGH; RAMMELL⁸⁸, 1981; SACERDOTE & PANDERAI¹⁹⁶, 1993).

Na outra via, a indometacina por inibir a ciclooxigenase impedindo a síntese de prostaglandinas e diminuindo o nível intracelular de AMPc, ativa os macrófagos à liberação de enzimas lisossomais capazes de promoverem a destruição tecidual (SCHULTZ et al.²⁰⁶, 1979), igualmente, gerando fatores quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos.

Após o período de 7 dias, os nossos resultados demonstraram que a indometacina aumentou a densidade do volume da região central de necrose com diferença significativa para o grupo controle, de maneira que o aumento ocorreu mais acentuadamente no período compreendido entre 7 e 14 dias (GRÁFICO XVI; TABELAS 6, 7, 8, págs 103, 104, 105, 106, 107 e 115). Tal resultado está em consonância com o trabalho de KUNKEL; CHENSUE; PHAN¹²⁵ (1988), segundo o qual, a indometacina por não inibir a síntese da IL-1 e do TNF- α pelos macrófagos, não interfere, ou, até mesmo, pode aumentar o fluxo celular para a região central do granuloma.

O acúmulo de células e a contínua produção do fator ativador das plaquetas (PAF) (ZICHE et al.²⁴⁶, 1990); que, por sua vez, aumenta a produção da IL-1 e a adesão celular ao endotélio vascular, estimula ainda mais a quimiotaxia celular para a região central de necrose, aumentando a sua densidade de volume. Todavia, após 7 dias, com a diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), da vascularização e,

consequentemente, das células em trânsito por essa região, há a redução da síntese e secreção dos produtos quimiotácticos e da destruição do material fibrinóide por essas células, ocorrendo o seu acúmulo na região central granuloma.

Aos 7 dias, a diferença estatisticamente não significativa ($p>0,05\%$) entre os grupos controle e indometacina (TABELA 7, págs. 104 e 105), indicou que o medicamento não alterou a densidade de volume do tecido granulomatoso. Não obstante, o fármaco tenha agido diminuindo a densidade do volume dos macrófagos (NM/F) presentes nesse tecido, sem alterar a densidade de volume das fibras colágenas (TABELA 8, 7; GRÁFICO XIV, XVII, págs. 103, 104, 105, 114 e 116), e, que, os resultados do exame microscópico descritivo por nós realizado apontaram, ainda, a redução da angiogênese. Tais efeitos podem ser justificados com base na não interferência na produção das citocinas vasoativas responsáveis (substância P, endotelina-3, PAF) pelo aumento da permeabilidade vascular, do edema e da geração dos fatores quimiotáticos para neutrófilos, compensando a redução da densidade de volume daquelas estruturas (NM/F e vascularização).

Possivelmente, o efeito redutor da vascularização tenha sido causado pela diminuição da concentração de PGE_2 , ainda, elevada no foco inflamatório, não completamente inibida pela indometacina, bem como pelo aumento da concentração de IL-1, decorrente dessa inibição, capaz de estimular a produção do ácido hialurônico inibindo a proliferação das células endoteliais (HOLZINGER et al.¹⁰¹, 1993). O estímulo da produção do anion superóxido, aumentando a tensão do oxigênio no interior do tecido granulomatoso, também, pode ter contribuído para a diminuição da angiogênese.

Outros mecanismos relacionados com a produção dos componentes da matriz extracelular podem ser inibidos pela indometacina, reduzindo a proliferação e a migração das células endoteliais, tais como: a inibição da óxido-nítrico-sintetase induzida pela diminuição da concentração do AMPc, resultando na redução da produção de fibronectina (PELEGATA et al. ¹⁷⁵, 1994; DURIEU-TRAUTMANN et al.⁵⁴, 1993; SMITH ²¹⁴, 1991); visto que esse componente é necessária à ligação à superfície celular da fibrina com o ácido hialurônico, estabilizando a matriz extracelular necessária à migração celular. Além do mais, a fibronectina participa da ligação dos produtos com propriedades angiogênicas resultantes da degradação do hialuronidato pela hialuronidase, (NORTON & BURSTONE ¹⁶⁰, 1989).

Tais efeitos, igualmente, contribuem para a diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), constatada nesse período experimental. Esse resultado indicou, já na fase inicial da formação do tecido granulomatoso, a inibição da formação dos monócitos pela indometacina. O mecanismo envolvido pode ser a redução dos fatores estimuladores de colônia (GM-CFC) necessários à proliferação das células progenitoras mieloides e a sua posterior diferenciação em monócitos e macrófagos.

A diminuição da densidade do volume do tecido granulomatoso, constatada principalmente entre os 14 e 28 dias ($p<0,05$), em parte pode ser explicada pela diminuição da vascularização após 7 dias; da densidade do volume dos macrófagos

(NM/F) verificada com maior intensidade após 14 dias ($p<0,05$); do exsudato inflamatório até 21 dias (GRÁFICO XII, pág. 113); bem como da diminuição da densidade de volume das fibras colágenas ($p<0,05\%$), no período experimental compreendido entre 21 e 28 dias (TABELA 6 e 7, págs. 103, 104 e 105).

Em relação à diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), os nossos resultados confirmaram o acentuado efeito antigranuloma da indometacina relatado por WINTER; RISLEY; NUSS²⁵⁸ (1963). Por outro lado, JAFFE & SANTORO¹⁰⁸ (1977) e de SANTORO et al.²⁰⁰ (1986) demonstraram que as prostaglandinas A, D e E têm efeito antiproliferativo. Segundo esses últimos autores, o efeito antiproliferativo produzido pela PGA₁ não envolveria a participação do AMPc, mas, sim, seria decorrente da indução pelas PGs da síntese de enzimas como a proteína quinase e a 2,5A-sintetase, cuja atividade, também, é estimulada pelo interferon- γ em cultura de L-fibroblastos. Nesse estudo, o tratamento com PGA inibiu a síntese de duas proteínas com peso molecular 92.000 e 46.000, enquanto aumentou a síntese de uma proteína com peso molecular de 74.000, cujo mecanismo envolvido pode ser decorrente do estímulo do grupo carbonil α - β -insaturados presente nas PGs.

Considerando que no período experimental de 21 dias a densidade do volume dos macrófagos (NM/F) e a vascularização diminuíram, a despeito da densidade do volume das fibras colágenas ter aumentado, é possível que a diminuição da síntese das prostaglandinas tenha estimulado a proliferação dos fibroblastos, nesse caso, confirmando o efeito antiproliferativo atribuído as PGs (SANTORO et al. 200, 1986; JAFE & SANTORO¹⁰⁸, 1977).

No presente trabalho o efeito antiproliferativo das prostaglandinas, em relação às células progenitoras mieloides dos monócitos, não foi confirmado, pois se assim fosse, a administração da indometacina, um potente inibidor da síntese e secreção das PGs, deveria promover a proliferação dessas células, aumentando, em relação ao grupo controle, a densidade do volume dos macrófagos, o que não ocorreu no presente trabalho, confirmando-se, portanto, em relação a essas células, o efeito proliferativo das PGs, possivelmente, via ativação da proteína G.

Contudo, cabe ressaltarmos que a diminuição da densidade do volume dos macrófagos presentes no tecido granulomatoso, também, pode estar relacionada à inibição dos mecanismos da síntese e secreção de outros mediadores químicos responsáveis pela quimiotaxia dos monócitos, bem como pelo bloqueio da diferenciação das células mieloides progenitoras em monócitos e, posteriormente, em macrófagos. Em consonância com essa última hipótese, citamos o estudo *in vitro* realizado por HONMA; KASUKABE; HOZUMI¹⁰³ (1979), no qual a indometacina bloqueou a diferenciação das células da leucemia mielóide de camundongos, indicando que as PGs, também, podem estar envolvidas na diferenciação final das células da linhagem mielóide em macrófagos.

A diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), no grupo medicado com indometacina, em relação ao controle, indicou o efeito antiproliferativo das células

progenitoras da linhagem mielóide capazes de se diferenciarem em monócitos/macrófagos pelos antiinflamatórios não esteróides, confirmando os resultados relatados por AKATSU & CATANZARO GUIMARÃES⁶ (1986).

Em relação às células endoteliais, tomando por base os resultados da nossa análise microscópica descritiva, que apontaram a diminuição da proliferação das células endoteliais até 14 dias, e a posterior diminuição do efeito inibitório da anglogênese determinando o aumento da densidade de volume ocupada pela vascularização, após esse período experimental, sugere o efeito dual das PGs é dependente do tempo. Mesmo assim, considerando que durante todo o experimento a densidade de volume ocupada pela vascularização no grupo medicado foi menor do que no grupo controle, igualmente, em relação às células vasculares se confirmou o efeito proliferativo das PGs.

McALLISTER et al.¹⁴ (1995), também, sugeriram a possibilidade de que o aumento da concentração intracelular do AMPc induzida pelo estímulo da síntese de PGs poderia inibir a ativação da proteína quinase por fatores de crescimento reduzindo a proliferação celular. Os resultados desse trabalho conjuntamente com os do presente estudo, em relação à diminuição do efeito inibidor da vascularização, apresentada pela indometacina após 14 dias, vêm ao encontro da afirmação de CATANZARO-GUIMARÃES²⁷ (1982) de que, em determinados sistemas celulares, a diminuição da concentração intracelular do AMPc induz o aumento do crescimento proliferativo celular.

Por outro lado, o aumento da vascularização após 14 dias, constatada por nossa análise microscópica descritiva, pode ter sido causada pela não interferência com a produção da substância P, secretada pelos nervos perivasculares, cujo efeito proliferativo das células endoteliais pode ser potencializada pelo aumento da IL-1 (FAN et al.⁸¹, 1993), bem como pela ação de outros fatores anglogênicos, tais como: o fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator transformador do crescimento (TGF β) não bloqueados pela indometacina.

A propósito do fator transformador do crescimento (TGF β) é possível que a sua presença no tecido granulomatoso, aumente o número de sítios de ligação dos receptores para as endotelinas estimulando a proliferação celular endotelial. Além do que, esse fator, também, pode potencializar o efeito angogênico do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PEPPER et al.¹⁷⁸ 1993).

A exemplo do que ocorreu em relação ao tenoxicam a indometacina, igualmente, apresentou efeito dual tanto aumentando (aos 21 dias) quanto reduzindo (aos 28 dias) a densidade do volume das fibras colágenas (TABELA 6,7; GRÁFICO X, XIV). É possível que essa ação possa ser explicada com base no efeito quelante de íons essenciais e inibidor da síntese das prostaglandinas dependente do tempo de administração.

Aos 21 dias o efeito estimulador da síntese do colágeno (GRÁFICO X) apresentado pelo fármaco pode ser justificado pelo efeito não inibidor do fator de crescimento

fibroblástico (FGF) e do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), produzidos pelas células endoteliais em decorrência da diminuição do efeito inibitório da vascularização constatado após 14 dias. O aumento da produção de IL-1, bem como o efeito estimulador da proliferação dos fibroblastos pelos fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), decorrente da inibição da síntese de PGE₂ pelo fármaco, também, pode ter contribuído para esse efeito (McALLISTER et al. 146, 1995).

Considerando a influência que o sistema imune exerce na síntese do colágeno, uma vez que os linfócitos, quando ativados, produzem linfocinas capazes de aumentar ou de diminuir a proliferação dos fibroblastos e a síntese do colágeno, e que as PGs, mais especificamente a PGE₂, aumenta a concentração do AMPc suprimindo a mitogênese das células T, reduzindo a produção de anticorpos e inibindo a citotoxicidade dependente dos anticorpos, é possível que a indometacina por regular para baixo os receptores para PGE₂ induza o estado de ativação dos macrófagos e células endoteliais à produção de citocinas como FGF, TGF, IL-1 e PDGF, e dos linfócitos para a produção de linfocinas como a IL-1 estimuladora da proliferação fibroblástica e da síntese do colágeno.

Entretanto, como após os 21 dias, provavelmente, tenha ocorrido o aumento acentuado da concentração de IL-1, ao nível do foco inflamatório, comparativamente ao período anterior; decorrente do aumento da densidade de volume ocupada pelos macrófagos (NM/F) e da angiogênese, constatada por nossa análise microscópica descritiva. O efeito inibidor dependente do tempo proporcionado pela alta concentração de indometacina, em relação à produção do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e da fibronectina pelos fibroblastos (SMITH et al. 214, 1991), que ao interagir com a fibrina forma uma extensiva matriz necessária à contínua proliferação dos fibroblastos e a organização das fibras colágenas, também, pode ser um outro mecanismo envolvido na redução da densidade de volume dessas fibras no referido período experimental.

O efeito supressivo apresentado pela indometacina na atividade das enzimas glucoronil e xilosiltransferase necessárias à síntese dos proteoglicanos (DAVID et al. 40, 1992), diretamente envolvidos com a proliferação, migração e diferenciação celular, bem como na síntese e secreção do colágeno, influenciando o diâmetro, a força tênsil, aumentando a estabilidade térmica e protegendo contra a digestão colagenolítica, também, pode ter contribuído para a redução da densidade do volume dessas fibras.

O fato da soma da densidade do volume de macrófagos (NM/F) e das fibras colágenas não totalizar a densidade de volume ocupada pelo tecido granulomatoso indica que além desses componentes, é possível que a indometacina possa influenciar outros componentes celulares não analisados no presente estudo.

Como exemplo citamos o efeito imunomodulador apresentado pela PGE₂ em relação às células do sistema imune presentes no granuloma. Embora as prostaglandinas inibam a mitogênese dos linfócitos e a produção e expressão dos receptores para IL-2, a produção de IL-4 e IL-5 pelas células T auxiliares parece não ser afetada, de maneira que as PGs apresentam em relação às células do sistema imune, efeitos tanto estimuladores quanto inibidores. (HARREL & STEIN 85, 1995).

Portanto, antiinflamatórios não esteróides como a indometacina, que bloqueiam a ciclooxigenase, diminuindo a produção de PGE₂ sem reduzir a produção dos produtos da 5-lipooxygenase como o LTB₄ e da citocina IL-1 podem estimular a proliferação das células T. Além do que, a baixa concentração de PGE₂ induzida pelo fármaco, também, pode estimular a proliferação das células B aumentando a produção de anti corpos IgG.

6.2.1.2.3. DEXAMETASONA

A dexametasona comparativamente ao grupo controle, no período de 7 dias, diminuiu a densidade de volume da região central do granuloma ($p<0,05\%$), com potência semelhante ao tenoxicam e superior, a da indometacina e ao metotrexato (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIII, XVII). Esse resultado conjuntamente com os resultados obtidos na realização do teste edemogênico, que apontaram o acentuado efeito da dexametasona às 6 horas, sugerem que esse fármaco no período compreendido entre 6 horas e 7 dias reduziu a quimiotaxia dos polimorfonucleares neutrófilos.

No referido período experimental, a diminuição da densidade do volume ocupado pela região central de necrose supurativa pode ter sido causada por vários mecanismos, dentre os quais, citamos: a inibição da síntese e secreção dos produtos metabólicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico, entre eles, os potentes agentes quimiotáticos LTs e modificadores da quimiotaxia como as PGs (SCHENKELAARS & BONTA²⁰⁴, 1983; CATANZARO-GUIMARÃES²⁷, 1982); a inibição da síntese de proteases neutras pelos macrófagos (WERB & GORDON²⁵³, 1975); a diminuição dos receptores da porção FC das imunoglobulinas (RUIZ et al.¹⁹⁵, 1991); o bloqueio da produção de interleucina-8 responsável pela quimiotaxia dos neutrófilos (HIRASAWA et al.⁹⁸, 1992; STANDFORD²¹⁹, 1992); a inibição da síntese e secreção de metaloproteinases pelos neutrófilos e macrófagos, assim como o bloqueio da transcrição das moléculas de adesão celular ICAM-1 (ODA & KATORI¹⁶¹, 1992; VAN DE STOLPE et al.²⁴¹, 1993); a inativação da proteína quinase C aumentando a secreção da enzima PAF-AH inativadora do fator ativador das plaquetas (KUCEY; CHEUNG; ROTSTEIN¹²³, 1992; NARAHARA; FRENKEL; JOHNSTON¹⁵⁴, 1993); e a inibição da enzima óxido-nítrico-sintase cujo produto o óxido nítrico (ON) está relacionado com o aumento da síntese de fibronectina pelas células endoteliais (PELLEGATA et al.¹⁷⁵, 1994).

Além desses mecanismos, devemos lembrar que a dexametasona por apresentar efeito imunosupressor, inibindo a proliferação dos linfócitos T e a produção de anticorpos IgG, IgM e IgA pelos linfócitos B (FOWLES et al.⁷¹, 1983), bloqueia as reações de hipersensibilidade do tipo imediato e tardia; reduzindo a destruição tecidual decorrente da formação de imunocomplexos, da ativação do complemento, da degranulação dos neutrófilos e da produção do radical superóxido e metabólitos derivados da oxidação do ácido araquidônico, fontes geradoras de fatores quimiotáticos.

Considerando o exposto, a diferença não significativa ($p>0,05$) entre a dexametasona, tenoxicam e o metotrexato, em relação à densidade de volume da região central dos granulomas, no período de 7 dias, pode indicar que esses dois medicamentos apresentam potência antiinflamatória semelhante e, que, possivelmente, tal como a dexametasona, inhibem mecanismos relacionados à produção dos fatores quimiotáticos para neutrófilos.

Considerando, ainda, o efeito análogo, em relação à inibição da densidade do volume da região central de necrose supurativa, apresentado pelo tenoxicam, comparativamente ao da dexametasona aos 7 dias (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XVI, XX), sugerimos que o tenoxicam, semelhantemente a esse medicamento, por inibir a produção de IL-1, possa, indiretamente, considerando o efeito sinérgico com a IL-8, estruturalmente semelhante a CINC, inibir essa citocina (SCHEINBERG; SANTORO; SANCHES²⁰²; 1990; TATAKIS²³⁰, 1993; TSAI et al.²³⁶ 1995; TAKIGAWA, et al.²²⁷, 1994).

Lembramos, também, que o efeito redutor da região central pode ter sido decorrente da inibição do fator estimulador macrofágico-granulocítico (GM-CSF), necessário à proliferação e a diferenciação das células progenitoras mieloides, resultando na consequente diminuição do extravasamento dos neutrófilos periféricos (HEATH et al.⁹³, 1990).

A análise do efeito antigranuloma, em função do tempo, apontou diferença significativa ($p<0,05$) entre 7 e 21 dias, revelando, que, nesse período experimental, a dexametasona produziu aumento da densidade do volume da região central do granuloma (TABELAS 6, 8; GRÁFICOS XVI, XX, págs. 115 e 117). Contudo, a análise microscópica descritiva dessa região demonstrou a sensível redução do número de neutrófilos e de macrófagos em trânsito por essa área, bem como, no período experimental compreendido entre 14 e 21 dias, o aumento do material granular eosinófilo de aparência fibrinóide, que se acumulou na região central do granuloma, em decorrência da sua não destruição por essas células.

O acúmulo desse material pode ser indicativa da inibição da formação de componentes da matriz extracelular, tais como o ácido hialurônico, proteoglicanas e fibronectina, cuja deficiência produz uma matriz defeituosa, incapaz de permitir a migração e a diferenciação celular impedindo a sua fragmentação (BERTOLAMI & BRONSON¹⁵, 1989). Também pode ser decorrente da inibição da produção das citocinas IL-1 e TNF pela população celular de macrófagos (NM/F) e células endoteliais, que coincidentemente, nesse período experimental, tiveram a sua densidade de volume diminuída (TABELA 6, pág. 103).

Quanto ao tecido granulomatoso, a diferença significativa ($P<0,05\%$) para o grupo controle, no período de 7 dias, demonstrou o efeito estimulador apresentado pela dexametasona (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XV, XIX, págs. 103, 104, 105 e 115 e 117).

Em grande parte, possivelmente, o aumento da densidade de volume desse tecido tenha sido causado pelo aumento da vascularização dos granulomas, constatado por nossa análise microscópica descritiva, via proliferação das células endoteliais por TNF- α .

Esse resultado sugere ainda a não interferência, nesse período inicial - até 7 dias -, na produção do FGF cujo efeito angiogênico é potencializado pelo TGF- β . Além do mais, os corticosteróides podem potencializar o efeito do PDGF produzido pelas células endoteliais, que proliferaram nesse período experimental, bem como pelas plaquetas, também, presentes no local da inflamação, estimulando a formação do tecido granulomatoso e o aumento da sua densidade, em relação ao grupo controle (ROTÉ & FALANGA¹⁹³, 1992).

O mecanismo envolvido, semelhantemente ao que foi constatado *In vitro* por PRAJGROD & DANON¹⁷⁸ (1992), pode ter sido decorrente do aumento da concentração das PGs, consequente ao estímulo inicial da atividade da fosfolipase A₂, pela potencialização do efeito da IL-1, promovida pela dexametasona, resultando no aumento da concentração do AMPc. Resultado semelhante foi constatado pelo nosso estudo microscópico descritivo, quando - aos 7 dias - observamos o aumento da angiogênese, enquanto que no grupo medicado com Indometacina verificamos a diminuição da vascularização. Tal resultado sugeriu que a concentração elevada de prostaglandinas tenha efeito angiogênico.

Esse efeito, também, pode ter sido causado pela acentuada hipoxia tecidual decorrente do bloqueio das duas vias de geração dos radicais livres, a partir da oxidação do ácido araquidônico; da diminuição da peroxidação lipídica, por aumento da lipogênese; e da redução biológica do oxigênio a H₂O e H₂O₂, por ativação das enzimas superóxido dismutase e catalase. Também, não descartamos a possibilidade do não bloqueio da produção de TGF- β estimular a síntese pelas células presentes no granuloma do PTHrP, que é um potente vasodilatador e estimulador da angiogênese (RIAN¹⁸⁷, 1994). Além do que, o TGF- β , igualmente, induz à expressão dos genes c-jun, jun-b e c-fos, ativando os fatores de transcrição mediadores da indução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PERTOVAARA et al.¹⁷⁷, 1994).

Portanto, como a densidade de volume ocupada pelos macrófagos (NM/F) diminuiu (TABELAS 6, 7; GRÁFICOS XIV, XVIII) págs. 103, 104, 105 e 115, enquanto que a ocupada pelas fibras colágenas foi semelhante ao controle (TABELA 6, 7; GRÁFICOS XVII, XVIII), é possível que além dos efeitos relacionados ao aumento da hipoxia tecidual, decorrente do seu efeito antioxidante capaz de estimular a angiogênese, o aumento da densidade de volume do tecido granulomatoso, constatado nos primeiros 7 dias, pode ter sido causado pelo estímulo das células musculares lisas à produção de endotelinas, capazes de ativar os receptores localizados na superfície de membrana dessas células ativando a fosfolipase C e estimulando a proliferação celular (WREN; HILEY; FAN²⁶¹, 1983).

Como a dexametasona não inibe a secreção do fator B (beta) transformador do crescimento (TGF- β), induzindo a expressão de protooncogenes estimuladores da

produção de outros fatores angiogênicos, tais como: o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PERTOVAARA et al.¹⁷⁷, 1994), estimula a angiogênese, aumentando, consequentemente, a densidade de volume do tecido granulomatoso. Lembramos, ainda, a possibilidade da ação sinérgica da IL-1 - nesse período experimental, ainda, não totalmente bloqueada (IL-1) pela dexametasona com a substância P e potencializada pelo TGF-β, como determinante do estímulo da neoformação vascular (FAN et al.⁶¹, 1993).

O TGF também potencializa outros fatores de crescimentos (IL-1, FGF, PDGF) liberados no tecido de granulação pelas células endoteliais, macrófagos e fibroblastos, capazes de estimular a síntese do colágeno e o aumento da densidade de volume do tecido granulomatoso (HOLM & MAISEL¹⁰⁰, 1992; KHALIL et al.¹¹⁷, 1993). Além do mais, esse fator pode estimular a proliferação das células mesenquimais e a produção dos componentes da matriz extracelular como glicoaminoglicanas e fibronectina, necessários à migração celular (ROTHE & FALANGA¹⁹³, 1992), justificando assim o aumento da densidade do volume das fibras colágenas - no período de 7 dias (TABELA 6, pág.103) - com diferença estatisticamente não significativa para o grupo controle (TABELA 7; GRÁFICOS XIII, XIV, pág. 104, 105 e 114). Tal resultado comprova a ação inicial promotora da síntese do colágeno pelos corticosteróides, seguida de um progressivo decréscimo na produção das mesmas (RAISZ & KREAN¹⁸³, 1983; CHYUN & RAISZ³³, 1994), indicando que a dexametasona não interfere, no referido período, com a produção da IL-1 e do FGF.

Como mencionamos anteriormente, a dexametasona por apresentar acentuado efeito antioxidante pode estimular a angiogênese no tecido granulomatoso, justificando o aumento significativo ($P<0.05$) desse tecido, em relação ao grupo controle aos 7 dias. Esse resultado associado aos dados constantes na tabela 7, que apontaram diferença significativa entre os grupos dexametasona e indometacina, sugere que a dexametasona, comparativamente a indometacina, apresenta - nesse período experimental - efeitos antioxidante e angiogênico mais potentes.

Contudo, no período compreendido entre 7 e 21 dias, verificamos o acentuado decréscimo da angiogênese dos granulomas, possivelmente, motivada pelo aumento da produção do fator inibidor do plasminogênio (PAI), inibindo a atividade do ativador do plasminogênio e a geração de plasmina, enzima ativadora da fibrinólise, necessária à migração das células endoteliais, uma vez que cria espaço para elas migrarem e se agregarem, formando os brotos celulares que posteriormente irão se diferenciar e originar a estrutura vascular (BLEI et al.¹⁹, 1993); pela regulação para baixo dos receptores para endoteliais (ETA), localizados nas células endoteliais (STANIMIROVIC; McCARRON; SPATZ²²⁰, 1994); e pela diminuição da produção das citocinas angiogênicas, tais como: a IL-1, PDGF, FGF, IGF e TGF, resultante da acentuada inibição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) aos 21 dias, e de IL-1, CSF e FGF decorrente da imunossupressão (HOLM & MAISEL¹⁰⁰, 1992).

A redução da angiogênese, também, pode ter sido causada pela redução da concentração do ácido hialurônico, proteoglicanas e fibronectina, no local da inflamação,

que conjuntamente com a fibrina forma uma extensa matriz sobre a qual ocorre a migração celular. Além do que, vários produtos resultante da metabolização dos seus componentes como o hialuronidato, controlam os processos de proliferação, diferenciação e migração das células endoteliais. A sua presença tem sido associada a inibição da angiogênese (NORTON & BURSTONE¹⁸⁰, 1989).

A diferença significativa da densidade de volume do tecido granulomatoso (TABELA 7), nos períodos de 7, 14 e 21 dias, entre os grupos controle e o medicado com dexametasona, indicou que o fármaco inibiu mais intensamente a densidade de volume daquele tecido no período compreendido entre 7 e 21 dias. Após esse período experimental perdeu parte do efeito inibidor, apresentando diferença não significativa em relação ao grupo controle (TABELAS 6 e 7; GRÁFICO XIX, XV, págs. 103, 104, 105, 115 e 117).

Em parte, esses resultados podem ser explicados com base na diminuição da densidade do volume ocupada por macrófagos (NM/F), constatada nos períodos experimentais de 7, 21 e 28 dias (TABELAS 6,7; GRÁFICOS XVIII, XIV), bem como pelo estímulo da síntese do colágeno verificada no período entre 21 e 28 dias (TABELAS 8, 7, 8; GRÁFICOS XIII, XVII, 103, 104, 105, 107, 108, 114 e 116) , via proliferação de fibroblastos.

A diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) aos 7 dias pode ser atribuída a inibição da produção dos fatores estimuladores de colônias celulares precursoras mieloides dos macrófagos (CSFs), bem como a inibição dos componentes da matriz extracelular necessários à proliferação, migração e diferenciação daquelas células em macrófagos e a síntese e secreção do colágeno.

O efeito inibidor da densidade do volume de macrófagos (NM/F), além de confirmar o efeito antiproliferativo das células progenitoras mieloides apresentado pelo fármaco, igualmente, está em consonância com os trabalhos de JAFARI et al.¹⁰⁷ (1993), FOWLES et al.⁸² (1993), que demonstraram o efeito bloqueador da transcrição gênica da IL-1 e do TNF- α , impedindo a ativação das metaloproteínas latentes, e a consequente geração dos fatores quimiotáticos para macrófagos.

A inibição da produção dos leucotrienos LTB₄ e LTD₄ pela dexametasona, também, pode contribuir para a inibição da IL-1, visto que esses leucotrienos são ativadores da produção dessa citocina (ROLA-PLESZCZYNSKY & LEMAIRE¹⁹¹, 1985). Todavia, cabe, ressaltar, que no presente trabalho o efeito bloqueador do TNF e da IL-1, possivelmente, tenha ocorrido mais acentuadamente após 7 dias, uma vez que - até esse período - o aparente estímulo da angiogênese proporcionada pelo fármaco indicou a presença dessas citocinas.

Outra consequência do efeito inibidor da produção da IL-1 e do TNF- α pelos macrófagos é a diminuição da síntese de fibras colágenas, visto que estimulam a proliferação dos fibroblastos e a síntese do procolágeno do tipo I, ácido hialurônico e fibronectina. Por outro lado, essas mesmas citocinas estimulam a síntese de colagenase promovendo a sua destruição (ROTHE & FALANGA¹⁹³, 1992; DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN⁴⁸,

1982). Esses últimos autores postularam que o efeito dos corticosteróides inibindo a síntese de fibras colágenas ocorria, indiretamente, mediante o bloqueio da síntese e secreção dessas monocinas (TNF e IL-1) pelos macrófagos. O nosso trabalho está em consonância com essa hipótese, visto que no período de maior inibição das fibras colágenas (entre 7 e 21 dias) ocorreu a diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) (TABELA 6, GRÁFICO XIV, pág. 103 e 114).

A diferença não significativa em relação à diminuição da densidade de volume das fibras colágenas apresentada pela dexametasona até 21 dias, pode ser interpretada como decorrente da inibição dos componentes da matriz extracelular, bem como do aumento da digestão colagenolítica, possivelmente, causada pela potencialização do efeito da IL-1 e TNF nos primeiros 7 dias. Igualmente, a potencialização do efeito dessas citocinas pode causar a ativação da fosfolipase A₂, o aumento da concentração das prostaglandinas no foco inflamatório e a diminuição da síntese do colágeno. Por outro lado, o aumento da produção do colágeno do tipo III, produzido pelas células endoteliais que proliferaram, possivelmente tenha compensado o efeito inibitório decorrente da diminuição dos macrófagos (NM/F), de maneira que a densidade de volume das fibras colágenas, comparativamente ao grupo controle, apesar de ter diminuída, estatisticamente, foi considerada não significativa ($P>0.05$).

Como no período compreendido entre 7 e 21 dias, a população celular de macrófagos (NM/F) e células endoteliais diminuiu; a produção por essas células dos fatores de crescimento (TGF, PDGF, IGF), capazes de estimular a síntese das fibras colágenas, comparativamente ao grupo controle, igualmente, diminuiu. Além do que, a dexametasona ao inibir a produção do LTB₄, inibe a produção de IL-2, impedindo a proliferação da população celular T e B, bloqueou a formação dos anticorpos reduzindo a produção da IL-1, dos CSFs e do FGF pelos linfócitos. Tal efeito pode ter contribuído para a redução da densidade de volume das fibras colágenas constatada nesse período experimental.

O aumento da densidade de volume dessas fibras constatado após os 21 dias, comprovado pela diferença estatisticamente significativa ($p<0.05\%$) entre os grupos controle e dexametasona, aos 28 dias (TABELAS 6, 7, 8, pág. 103, 104, 105, 106 e 107), confirma o estudo de (AYANLARBATERMAN et al. ¹⁰, 1991), que demonstraram na fase tardia do processo inflamatório crônico a não inibição da síntese do colágeno pelos fármacos corticosteróides.

Possivelmente, essa ação decorre do efeito mínimo que os antiinflamatórios esteróides apresentam em relação à inibição da síntese e secreção do TGF-β, pela população celular de macrófagos (NM/F), a qual - aos 28 dias-, apresentou-se em menor número do que nos grupos medicados com antiinflamatórios não esteróides (Indometacina e tenoxicam) e pelas células vasculares presentes em maior número no grupo medicado com dexametasona. O TGF produzido por essas células pode potencializar o efeito estimulador da angiogênese e da síntese do colágeno proporcionado pelo fator de crescimento fibroblástico (FGF) e pelo fator de crescimento

endotelial vascular (EVGF), aumentando, também, a produção de várias citocinas pelas células endoteliais, dentre as quais a do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), que conjuntamente com o TGF produzido pela população restante dos macrófagos têm efeito estimulador da síntese do colágeno.

O efeito estimulador da produção dessas fibras, também, pode ser explicado por uma resistência dos fibroblastos a administração prolongada de dexametasona, resultando numa maior produção das citocinas estimuladoras da produção de fibras colágenas (IGF, FGF), até então, mais acentuadamente inibidas por esse fármaco. Uma outra possibilidade decorreria do efeito proliferativo dos fibroblastos apresentado em decorrência da inibição da síntese das prostaglandinas induzida pelo fármaco.

Portanto, o efeito bifásico tanto estimulador como inibidor, em relação à densidade de volume das fibras colágenas, dependente do tempo de administração, apresentado pela dexametasona, sugere que a IL-1 em alta concentração inibe a síntese de colágeno, enquanto que em baixa concentração, promove o estímulo a sua formação. O mecanismo envolvido parece ser dependente do bloqueio da síntese de prostaglandinas.

6.2.1.2.4. METOTREXATO

Em relação à duração do efeito antigranuloma, constatamos durante todo o experimento, que o metotrexato reduziu a densidade do volume dos macrófagos (NM/F), bem como das fibras colágenas após 21 dias. Os dados constantes na tabela 7 demonstram que esse fármaco até 21 dias não apresentou diferença significativa ($p>0.05\%$) para o grupo controle em relação à inibição da densidade de volume do tecido granulomatoso e da região central do granuloma (GRÁFICOS XV, XIV, XVI, XIX, XX, págs. 115, 116 e 117).

Aos 28 dias, o metotrexato, comparativamente ao grupo controle, agiu aumentando a densidade de volume da região central com diferença estatisticamente significativa ($P<0.05\%$). O aumento inferior ao proporcionado pelo tenoxicam e semelhante ao produzido pela indometacina e dexametasona (TABELA 7, GRÁFICO XVI, XX, págs. 103, 115, 117), indicou que o melotrexato por inibir menos acentuadamente a quimiotaxia celular para a região central de necrose supurativa induz maior fluxo celular por essa região, causando a fragmentação do material granular eosinófilo fibrinóide; o aumento da vascularização e da síntese do colágeno; bem como a sua substituição por tecido granulomatoso, reduzindo a densidade de volume ocupada por esse material na região central do granuloma. Esse resultado, também, é indicativo de um menor efeito antigranuloma comparativamente ao apresentado pelo tenoxicam, possivelmente por não atestar a produção do VEGF e por gerar ROS.

Em relação à densidade de volume do tecido granulomatoso, o fato da diferença para o grupo controle não ter sido estatisticamente significativa ($p>0.05$) até o período experimental de 28 dias, a despeito de ter ocorrido a diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) (dos 7 aos 28 dias) e das fibras colágenas (dos 14 aos 28 dias), sugere que o metotrexato - na dose terapêutica convencional - ao mesmo tempo em que inibe a densidade do volume de alguns componentes do tecido granulomatoso, possivelmente, não altera, ou até mesmo, pode aumentar a densidade de volume ocupada pela vascularização do granuloma, a qual provavelmente ocupa a maior densidade do volume daquele tecido (TABELAS 6, 7 e 8, pág. 103, 104, 105, 106, 107).

Os resultados da nossa análise microscópica descritiva demonstraram que o efeito estimulador da angiogênese, no período experimental de 7 dias, decresceu com o decorrer do tempo, de maneira que após 14 dias passou a inibir a angiogênese. Esses resultados, particularmente, após 7 dias, estão de acordo com o trabalho de CRONSTEIN³⁸ (1992), segundo o qual é sugerida a possibilidade do metotrexato inibir a proliferação das células endoteliais e a neoformação vascular.

Tomando por base os resultados da nossa análise microscópica descritiva, entendemos que esse fármaco, poderia, por meio de um efeito dependente do tempo, tanto estimular como inibir a proliferação das células endoteliais. Na tentativa de justificarmos a nossa ilação citamos o trabalho *In vitro* realizado por WILLIAMS; TOPLEY; WILLIAMS²⁵⁶ (1994), no qual foi demonstrado que a adição do metotrexato na cultura de macrófagos, em dose atóxica, não inibia a produção do TNF- α . Portanto, a diferença não significativa para o grupo controle ($P>0.05$) até o período de 28 dias, dever-se-ia ao fato do medicamento, quando administrado na dosagem terapêutica convencional, não inibir a secreção do TNF- α pela população celular presente no tecido granulomatoso, que a exemplo da IL-1 pode estimular a proliferação e a migração das células endoteliais.

Também é possível que o efeito proliferativo dessas células seja decorrente da inibição pelo metotrexato da produção das PGs, que, como sabemos, é um inibidor da produção da citocina angiogênica IL-1 (CRONSTEIN³⁸, 1992; TATAKIS²³⁰, 1993). Além do que, o aumento da concentração de AMPc induzida pelas PGs pode inibir via inativação da proteína quinase, o efeito estimulador da síntese do DNA e da proliferação das células musculares lisas, pelos fatores de crescimento epidérmico (EGF) e derivado das plaquetas (PDGF) (McALLISTER et al. 146, 1995).

Em consonância com esses mecanismos citamos os resultados da nossa análise microscópica descritiva, que apontaram o efeito inibidor da síntese das prostaglandinas pelos antiinflamatórios não esteróides (tenoxicam), esteróide (dexametasona) e citostático (metotrexato) como estimulador da angiogênese.

O elo de ligação entre o mecanismo estimulador da vascularização apresentado pelo tenoxicam, metotrexato e dexametasona - aos 7 dias -, ao contrário da indometacina, que nesse período experimental reduziu a angiogênese, pode ser a hipoxia

tecidual decorrente do efeito antioxidante dos radicais livres produzido pela metabolização do ácido aracídônico, bem como dos radicais livres solúveis em água, capazes de estimular à produção do ácido úrico, resultante da estimulação do sistema enzimático da XD/XO, induzida pela diminuição da tensão do oxigênio.

Outra consequência importante da hipóxia tecidual induzida pelos fármacos é a indução das células musculares lisas à produção de citocinas mitogênicas para as células endoteliais como as prostaglandinas (PGs) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que ao se ligarem aos receptores associados a proteína G e a receptores capazes de promoverem a hidrólise dos glicolipídeos contendo inositol da membrana das células endoteliais ativam as proteínas citoplasmáticas estimulando a produção dos fatores de transcrição nuclear iniciadores da proliferação (MICHELS et al. ¹⁴⁵, 1994).

Além desse mecanismo, por intermédio do aumento da concentração local de adenosina o metotrexato, também, pode induzir a hipóxia tecidual estimulando a angiogênese. Entretanto, o mecanismo envolvido no estímulo proliferativo endotelial é pouco esclarecido. O fato desse efeito não ter sido reproduzido por ligantes seletivos dos receptores A₁ e A₂ como 5-N-etilcarboxamida adenosina ou 2-5 dideoxiadenosina, nem ter sido bloqueado pelo antagonista desses receptores 8-fenilteofilina, sugere que o mecanismo não envolve a ativação daqueles receptores (VAN-DAELE et al. ²⁴⁰, 1992).

É, igualmente, possível que ele esteja relacionado à síntese dos nucleotídeos contendo purina, estimulado pelo fator de crescimento fibroblástico (FGF) não bloqueado pelo metotrexato (HIRAI et al. ⁹⁹, 1993). Portanto, a adenosina após ter sido metabolizada em adenina e inosina origina hipoxantina e xantina, a qual para ser metabolizada pela enzima xantina oxidase em ácido úrico e peróxido de hidrogênio, causa a queima de O₂ e a utilização da H₂O promovendo a hipóxia tecidual e o estímulo a angiogênese.

Também não devemos omitir a possibilidade de que o metotrexato ao inibir a síntese protéica, semelhantemente ao antibiótico cicloheximida, que, possivelmente, ao inibir a produção de moléculas protéicas repressoras gênicas capazes de se ligarem ao locus operador, impedindo o início da transcrição pela RNA polimerase, promovem o aumento da transcrição da informação gênica necessária à produção do PTHrP. Um outro mecanismo possível é a estabilização do RNAm-PTHrP, por diminuição das proteínas que promovem o ataque do RNAm por nucleases, estabilizando-o, aumentando a sua vida e estimulando a produção e a secreção do PTHrP pelas células endoteliais. Esse peptídeo, agindo por meio de um efeito paracrino ativaría os receptores localizados nas células musculares lisas da parede vascular as estimulando à proliferação e, consequentemente, aumentando a angiogênese (RIAN ¹⁸⁷, 1994; ROSOL & CAPEN ¹⁹², 1992).

O efeito inibidor da angiogênese constatada por meio da nossa análise microscópica descritiva após os 7 dias, seguida do gradual aumento desse efeito ocorrido naquele período, sugere a exemplo do que ocorreu com os demais fármacos testados, efeito dependente do tempo e da concentração.

Uma outra possível explicação para a não diminuição da densidade de volume do tecido granulomatoso, até o período de 28 dias (TABELAS 8, 8, GRÁFICOS XV, XIX), seria a interferência na síntese protéica, resultante na não produção das coenzimas nucleotídicas necessárias à formação dos componentes do tecido conjuntivo, tornando-o mais permeável, bem como reduzindo as proteínas teciduais e sanguíneas. Em decorrência disso é possível que haja o aumento do volume do fluido extracelular compensando a diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F), constatado durante todo o experimento, da vascularização após 7 dias e das fibras colágenas após 21 dias. Entretanto, essa hipótese não foi ratificada pelos nossos resultados, uma vez que durante todo o experimento o metotrexato diminuiu o componente exsudativo do granuloma (peso diferencial) (GRÁFICO IX, pág. 112).

Já, a Inibição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) constatada durante todo o experimento é facilmente explicada pela semelhança estrutural do fármaco com o ácido fólico, que possibilita a sua ligação à enzima diidrofolato desidrogenase, inibindo-a especificamente (inibição competitiva) e bloqueando a fase de síntese (S) do ciclo celular, necessária à proliferação das células mieloides precursoras dos monócitos; por seu efeito imunomodulador redutor da produção das linfocinas (INF- γ , CSFs, IL-1, MIF, LIFs), bem como pela Inibição de outros agentes quimiotácticos para macrófagos/fibroblastos (TGF, IL-1, TNF- α) e estimuladores da proliferação celular (PDGF, CSF, PGs) produzidos pelas células endoteliais e plaquetas (PDGF, PGs e LTs).

Considerando a participação do sistema imunológico no controle da fibrogênese, o aumento da densidade de volume das fibras colágenas, constatada entre 14 e 21 dias (TABELAS 8, 7 e 8; GRAFICOS XIII, XVII), em parte, pode ser explicado pela redução induzida pelo fármaco da produção do LTB₄, secretado pelos neutrófilos, capaz de inibir a proliferação das células T estimuladas por mitógenos e induzir a proliferação das células supressoras. Em decorrência desse efeito, gerar-se-iam citocinas (IL-1, FGF e INF- γ) capazes de estimular a produção das fibras colágenas.

Por outro lado, a diminuição da densidade do volume dessas fibras após 21 dias, em parte, pode ser explicada com base no efeito imunosupressivo direto promovendo a destruição dos linfócitos e, consequentemente, bloqueando a produção das linfocinas capazes de estimular a proliferação dos fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (CSF, FGF e IL-1), bem como a produção das fibras colágenas (IL-1 e FGF) pelos fibroblastos e células endoteliais.

Indiretamente, por meio da diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F), decorrente da inibição das colônias de células progenitoras mielóide dos monócitos/macrófagos, consequente ao bloqueio das modificações protéicas pós-transcricionais necessárias à síntese do LTB₄, causando acentuada diminuição da produção de IL-1, que, como sabemos, é um potente indutor da síntese do fator estimulador da colônia celular de macrófagos (M-CSF), haveria a redução da geração de outras citocinas, tais como: PDGF, TGF, FGF e IL-1, capazes de estimular os fibroblastos e as células endoteliais a produção das fibras colágenas.

Além do que, como mencionamos anteriormente, a reação enzimática de hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina, necessária à síntese de fibras colágenas, respectivamente, pelas enzimas procolágeno-lisina-hidroxilase e procolágeno-prolina-hidroxilase, requer O_2 , Fe^{+2} , α -cetoglutarato e ácido ascórbico. Portanto, ao nível molecular, também, poderíamos explicar a diminuição da densidade de volume das fibras colágenas, comparativamente ao grupo controle, após o período experimental de 21 dias, com base na inibição pelo fármaco de coenzimas nucleotídicas, necessárias à síntese da lisina (NAD^+ , NADPH, COA), da prolina (NADH), bem como do α -cetoglutarato (NAD^+ , NADPH), diretamente envolvidas na síntese do colágeno.

Apesar do agente flogógeno indutor da formação do tecido granulomatoso, usado no presente estudo, ser diferente do utilizado no trabalho de ELEAMUZIE & NJOKU⁵⁷ (1992), os nossos resultados confirmaram o efeito mais acentuado do metotrexato na fase tardia do processo inflamatório crônico. Não obstante, tenha agido durante todo o período experimental diminuindo a densidade do volume dos macrófagos (NM/F), o efeito antigranuloma foi mais acentuado dos 21 aos 28 dias (TABELAS 6 e 7, págs. 103, 104 e 105), uma vez que foi o período de maior inibição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) (21 dias), bem como das fibras colágenas e da vascularização (28 dias).

6.3. ANÁLISE DOS PESOS ÚMIDO, SECO E DIFERENCIAL

O diferença entre os pesos úmido, seco e diferencial proporcionado pelos fármacos antiinflamatórios testados apresentou diferença estatisticamente não significativa ($P>0,05$). Tal resultado indica que o peso dos componentes celulares e fibrosos é semelhante ao peso do componente exsudativo. Para que esse efeito tenha ocorrido, os fármacos devem ter agido inibindo o componente exsudativo do tecido granulomatoso e da região central, bem como os componentes celulares e fibrosos presentes no tecido granulomatoso.

Porém, esses fármacos inibiram mais acentuadamente o componente edematoso, visto que foi constatada diferença significativa entre os pesos úmido e seco no período de 7 dias ($p<0,05$). Esse resultado sugeriu que na fase inicial de formação do granuloma predomina o componente exsudativo evidenciado pelo edema no tecido granulomatoso e pelo exsudato supurativo na região central do granuloma.

Aos 14 dias a diferença significativa ($p<0,05$) entre os pesos úmido e seco (tabela 5), ainda, indicou o predomínio do componente exsudativo. A diferença, igualmente, significativa ($p<0,05$) entre os pesos seco e diferencial ($P<0,05$) em relação ao percentual inibitório apresentado pelos fármacos testados, revelou que esses medicamentos inibiram mais acentuadamente os componentes celulares e fibrosos do granuloma (tabela 5, pág. 102). Esse resultado associado ao elevado percentual inibitório apresentado pelo Inibidores da ciclooxygenase (Indometacina e dexametasona) está em consonância com a hipótese de que os produtos do metabolismo do ácido araquidônico

(LTB₄ e PGE₂) participam do controle da transição da fase exsudativa para a proliferativa dos granulomas.

Nesse período experimental, ainda, merece destaque o reduzido efeito inibitório dos pesos úmido e seco apresentado pelo tenoxicam (tabela 5). Esse resultado foi confirmado pela análise histomorfométrica realizada, uma vez que a densidade de volume do tecido granulomatoso não apresentou diferença significativa para o grupo controle (TABELA 7, pag. 104 e 105), comprovando o efeito reduzido que esse fármaco apresentou em relação à inibição dos componentes celular, fibroso e edematoso, nesse período experimental (GRÁFICOS XV, XIV, VII, VIII, IX, págs. 114, 111).

Aos 21 dias, os medicamentos testados alteraram tanto o componente edematoso quanto os componentes celular e fibroso, conforme foi demonstrada pela diferença não significativa entre os pesos úmido, seco e diferencial. Contudo, o efeito desses fármacos inibiu mais acentuadamente os componentes celulares e fibrosos, segundo foi demonstrada pela diferença significativa entre os pesos úmido e diferencial. Salientamos, ainda, nesse período, o aumento da inibição dos componentes celulares, fibroso e edematoso pelo tenoxicam e metotrexato; bem como o aumento inibitório do componente edematoso apresentado pela dexametasona (GRÁFICOS VIII, X, XII, págs. 111, 112 e 113).

O aumento da potência do tenoxicam, em relação à inibição dos componentes celulares, fibrosos e edematoso do granuloma, foi confirmado por nossa análise microscópica descritiva e histomorfométrica, as quais demonstraram a acentuada diminuição da densidade de volume do tecido granulomatoso (GRÁFICO XVI), decorrente da acentuada diminuição da densidade de volume de macrófagos (NM/F) e da vascularização dos granulomas, constatada aos 21 dias (GRÁFICO XV). Tais resultados indicam o período experimental em que a potência antiinflamatória do tenoxicam foi máxima.

Aos 28 dias a diferença estatisticamente significativa ($P<0,05\%$) entre os pesos úmido e seco, revelou a diminuição do componente exsudativo dos granulomas (TABELA 5). A diferença, igualmente, significativa ($p<0,05\%$) apresentada pelos percentuais de inibição dos fármacos testados, em relação aos pesos seco e diferencial demonstrou que esses fármacos agiram reduzindo, principalmente, o componente edematoso do granuloma (GRÁFICOS VIII, IX, págs. 111 e 112).

Nesse período experimental, destacou-se o efeito contrário apresentado pela dexametasona em relação à indometacina e tenoxicam, pois o primeiro fármaco aumentou o peso seco dos granulomas, enquanto que os últimos, o reduziram (GRÁFICO IX). Possivelmente, esse resultado pode ser explicado com base no aumento da densidade do volume das fibras colágenas produzido pela dexametasona aos 28 dias (GRÁFICOS XIII, XVII), bem como pela diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) (GRÁFICO XIV, pag. 114) e das fibras colágenas (GRÁFICO XIII, pag. 114) proporcionada pelos inibidores da ciclooxygenase.

Em relação à inibição do componente edematoso, a dexametasona apresentou efeito contrário aos inibidores da ciclooxigenase e do metotrexato, pois estimulou o aumento desse componente tanto na região central como no tecido granulomatoso, (TABELA 7; GRÁFICOS VII, VIII, IX, págs. 104, 105, 111 e 112). Possivelmente, esse efeito tenha como explicação o fato de que os corticosteróides, quando administrados por períodos prolongados, podem causar retenção hidrosalina. Além do mais, ao interferirem com a síntese protéica, necessária à estruturação do tecido conjuntivo, permitem a passagem de grandes moléculas para o ambiente extravascular produzindo edema.

7. O PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA

Com relação ao mecanismo inicial da estimulação do processo reabsortivo ósseo, supõe-se ocorrer a resposta de uma rede de células da linhagem osteoblástica (células de revestimento ósseo) a um estímulo físico ou hormonal, capaz de direcionar os osteoclastos para a superfície óssea a ser reabsorvida. Entretanto, a natureza do fator responsável pela geração desses estímulos permanece pouco esclarecida. A tentativa de elucidá-la, instigou-nos a inferência de que as células presentes no infiltrado inflamatório, dentre os quais macrófagos, linfócitos e plasmócitos promoveriam a liberação de enzimas e citocinas, que conjuntamente com a colagenase liberada pelos osteoblastos destruiriam o material orgânico não reabsorvível.

Em decorrência da fragmentação do material orgânico presente no tecido osteóide, da produção local de citocinas (IL-1, TNF), bem como de fatores de crescimento (EGF, TGF) e dos fatores estimuladores de colônia (GM-CSF, M-CSF) pelas células inflamatórias, pode ocorrer em nível local, o estímulo das células presentes no infiltrado inflamatório e dos osteoblastos periféricos, que por indução molecular se afastaram do tecido ósseo dando lugar aos osteoclastos, à produção de uma substância de natureza hormonal, provavelmente o PTHrP, que agindo tanto autócrina como parocrinamente conjuntamente com as citocinas liberadas por aquelas células e com o PTH secretado pelas paratireóides estimuladas por esses peptídeos, induziriam via osteoblastos à reabsorção osteoclástica.

Entendido o mecanismo inicial de ativação do processo reabsortivo osteoclástico discorreremos a seguir a respeito de outro tema polêmico, qual seja, a origem da vitamina D₃. Como foi mencionado na revisão da literatura, a vitamina D₃ participaativamente tanto do processo de formação como de reabsorção óssea, tendo origem exógena proveniente da dieta ou endógena por irradiação do desidrocolesterol da pele.

Entretanto, como além da pele, os rins, os ossos, as glândula mamárias, o cérebro, o músculo e os órgãos linfóides apresentam receptores de membrana para a proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), estruturalmente semelhante aos receptores para o PTH (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992), também, é possível que em condições patológicas tanto o PTH como PTHrP, além do estímulo renal à síntese da 25-

dihidroxicolecalciferol-hidroxilase aumentando à formação do dihidroderivado ativo por ativação da 1 alfa-hidroxilase, também, estimulem as células de outros tecidos à metabolização da 25 hidroxivitamina D₃ em 1 alfa 25-hidroxivitamina D₃.

A propósito disso, recentemente, demonstrou-se que os macrófagos alveolares presentes no tecido inflamado apresentam atividade da 1 alfa-hidroxilase (GYETKO et al., 841994). Além do PTH e do PTHrP, a IL-1, a IL-2, TNF- α e o INF- γ podem estimular essas células à produção de vitamina D₃. A produção extra-renal de vitamina D₃ ou de moléculas semelhantes, igualmente, pode ser constatada em neoplasias como o linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin e carcinosarcoma (ROSOL & CAPEN¹⁹², 1992). Isso indica, que, teoricamente, sob determinadas condições patológicas qualquer célula pode produzir vitamina D₃.

Um outro mecanismo pouco esclarecido é o escape dos osteoclastos a ação inibidora da osteoclasia promovida pela calcitonina. Várias teorias têm sido postuladas na tentativa de explicá-lo. Dentre elas, as mais apregoadas são a de LORENZO¹³⁵ (1991), de MEGJI¹⁵⁰ (1992) e de MALGAROLI et al.¹³⁸ (1989) já apresentadas quando da revisão da literatura. Com base na teoria da ocupação dos receptores, que afirma ser a atividade biológica proporcional ao número de receptores ocupados, segundo a concentração do hormônio e do número de receptores por unidade de área ou volume, sugerimos a possibilidade do mecanismo envolvido na inibição da osteoclasia ser decorrente da ocupação dos receptores inibidores da osteoclasia, com o deslocamento das moléculas antagonistas do centro específico desses receptores, por uma concentração de calcitonina discretamente acima do normal mantida por um período prolongado de tempo, capaz de proporcionar um número adequado de interações e de ocupação desses receptores. Na tentativa de justificar essa hipótese lembramos que em indivíduos portadores de carcinomas medulares com ausência de calcitonina circulante ou com hipersecreção desse hormônio, possuem o nível sérico de cálcio normal e não apresentam anormalidades esqueléticas, indicando que a inibição da reabsorção óssea somente ocorre em nível discretamente acima do normal (LORENZO¹³⁵, 1991).

Em outras palavras, a ausência, o excesso ou a concentração discretamente acima do normal, mantida por um período reduzido de tempo, não ativariam adequadamente os receptores responsáveis pela inibição da osteoclasia. A primeira situação dever-se-ia a não ocupação desses receptores, enquanto que a segunda, possivelmente, seria motivada pela saturação dos receptores de maneira que o excesso não produziria qualquer efeito adicional. Na última situação, o provável mecanismo de escape poderia ser explicado pelo fato do tempo reduzido não possibilitar a ocupação dos receptores em número suficiente. Outrossim, acreditamos que a calcitonina, na dependência da concentração e do tempo, ao se encaixar nos receptores de membrana responsável pela osteoclasia, induza-os a modificações conformativas capazes tanto de inibir a osteoclasia, quanto permitir a ligação dos antagonistas da calcitonina estimulando a osteoclasia.

Uma outra questão polêmica é a diferença de reação apresentada pelos tecidos mineralizados quanto ao processo de reabsorção. A diferente reação do osso em relação à do cimento, em parte, pode ser explicada pelo fato do osso ser vascularizado (ARMITAGE⁸, 1989). Devido à vascularização os processos degenerativos provocados por distúrbios circulatórios são mais facilmente constatados no osso do que no cimento, que por ser avascular e apresentar baixo metabolismo, quando exposto à inflamação, reabsorveria menos intensamente do que o tecido ósseo (TEN CATE²³², 1988). LINDSKOG & HAMMARSTRÖM¹³¹ (1980), também, sugeriram a possibilidade da maior resistência do cimento à reabsorção dever-se à secreção pelas células do cimento ou do ligamento periodontal de fatores antilíngua, capazes de neutralizar a colagenase secretada pelos macrófagos, clastos e blastos presentes nas proximidades do cimento.

Durante a fase avançada da doença periodontal tanto nas proximidades do osso alveolar quanto na superfície radicular, o periodonto normal é infiltrado por células inflamatórias, provenientes, em grande parte, dos vasos intraalveolares, que nesse estádio aumentam em número. Portanto, a fonte geradora de células mesenquimais indiferenciadas necessárias à formação dos osteoblastos, que conjuntamente com os osteoclastos constituem as unidades de reabsorção óssea, que, nas proximidades da superfície óssea e no interior dos espaços medulares, aumentam em número (BRUDVIK & RYGH²⁵, 1994).

Pelo lado radicular como o cimento é não vascularizado, a via de geração dos blastos é depende exclusivamente das células mesenquimais indiferenciadas presentes no tecido conjuntivo inflamado, reduzindo-se assim, o número das unidades de reabsorção. Além do mais, não há qualquer evidência de que as células formativas (cementoblastos e odontoblastos) apresentem a mesma capacidade de estimular os clastos ao processo de reabsorção semelhantemente ao que ocorre com os osteoblastos (SASAKI²⁰¹, 1992). É possível que a fase inicial da reabsorção dentária (do cimento) se deva quase que exclusivamente a atividade reabsortiva dos macrófagos e fibroblastos presentes no ligamento periodontal. Em consonância com essa hipótese citamos o trabalho de AKAMINE et al.³ (1994).

Para finalizar cabe esclarecer que algumas das ilações referente ao mecanismo de ação dos fármacos apresentadas no presente trabalho foram por nós elaboradas tendo por base o conhecimento teórico adquirido com a revista da literatura, muitos dos quais realizados *In vitro*, portanto, necessitando para a sua ratificação de futuros trabalhos experimentais *In vivo*. Assim sendo, fica patente a imperiosidade do leitor valendo-se do seu acurado senso crítico assimilar aquelas que parecem coerentes desprezando as que parecem insanas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES:

Com base na análise do efeito antiinflamatório agudo e crônico, bem como do mecanismo de ação dos medicamentos testados, concluímos que:

7.1. EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO AGUDO

A potência antiinflamatória está diretamente relacionada com a concentração sérica do agente flogógeno; com os diferentes mecanismos envolvidos na estimulação flogística, segundo o modelo experimental empregado; com a dose e dissociação do fármaco; e com a ocupação dos seus receptores, segundo a lei de ação das massas.

No modelo inflamatório agudo induzido pela placa microbiana dental e paracocidioidina, salientou-se, na primeira hora, no aumento da permeabilidade vascular, a participação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (PGs e LTs), comparativamente ao modelo induzido pela carragenina, no qual participação desses produtos ocorreu mais acentuadamente após 1 hora, visto que nesse período experimental, possivelmente, tenha ocorrido a participação de outras citocinas vasoativas.

Tanto as prostaglandinas quanto os leucotrienos, assim como outros mediadores químicos liberados no local da inflamação, podem estimular as células endoteliais à produção de peptídeos vasoativos capazes de controlar a permeabilidade vascular.

7.1.1. MODELO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELA CARRAGENINA

O processo inflamatório agudo induzido pela carragenina é bifásico, de maneira que a estimulação flogógena causada por esse agente, inicialmente, produz a liberação de mediadores químicos, tais como a histamina e derivados dos sistemas da coagulação, das cininas e do complemento, bem como estimular as células endoteliais à produção de outras citocinas vasoativas capazes de aumentar a permeabilidade vascular e a exsudação plasmática.

O acentuado efeito apresentado pelo metotrexato sugere a inter-relação entre o sistema do complemento e a síntese de PGs, salientando-se a participação mais acentuada dos mediadores químicos derivados do ácido araquidônico (PGs e LTs) a partir de uma hora.

A diminuição do efeito inibitório da indometacina e do tenoxicam indica o decréscimo da participação das prostaglandinas. Contudo, o acentuado efeito

apresentado pela dexametasona e metotrexato sugere o aumento da participação dos leucotrienos e de outras citoquinas quimiotáticas para neutrófilos após 3 horas.

O reduzido efeito apresentado pelos antiinflamatórios não esteróides (indometacina e tenoxicam) pode ser decorrente do efeito estimulador da síntese de óxido nítrico induzida pela baixa produção de PGE₂.

O acentuado efeito apresentado pelo metotrexato, no período de 6 horas, pode ter sido causado pela inibição da síntese do óxido nítrico, consequente ao bloqueio da síntese da óxido-nítrico-sintase e de outras citoquinas relacionadas ao funcionamento dessa enzima (IL-1, TNF- α , ET-3) e quimiotáticas para neutrófilos (LTB4, TNF- α , PGE2).

O efeito, igualmente acentuado apresentado pela dexametasona às 6 horas, provavelmente, decorreu da regulação para baixo dos receptores para endotelinas e da inibição das citoquinas vasodilatadoras e quimiotáticas para neutrófilos, dentre as quais: LTB4, PAF, TNF- α , IL-6, IL-8 e CINC.

7.1.2. MODELO INDUZIDO PELA PLACA MICROBIANA DENTAL

O modelo inflamatório induzido pela placa microbiana dental demonstrou ser mais acurado para o teste de medicamentos antiinflamatórios, em enfermidades nas quais o agente flogógeno induz acentuada produção dos metabólitos derivados do ácido araquidônico.

O estímulo flogógeno proporcionado pela placa microbiana dental comparativamente ao modelo da carragenina induziu acentuada produção de prostaglandinas e leucotrienos, já na fase inicial do processo inflamatório, indicando a sua maior potência flogogênica.

O acentuado efeito antiinflamatório apresentado pelo metotrexato, em relação à inibição das proteases, após 1 hora, sugere acentuada participação dessas enzimas na estimulação flogogêna induzida pela placa microbiana dental (PMD).

No período de 1 hora, o aumento do efeito antiinflamatório do metotrexato e da dexametasona indica a participação dos leucotrienos e dos produtos derivados da ativação do sistema do complemento, além da resposta imune humoral.

O efeito menos acentuado apresentado pelos antiinflamatórios não esteróides às 6 horas, comparativamente ao antiinflamatório esteróide (dexametasona) e da droga citostática (metotrexato), sinaliza que os antiinflamatórios não esteróides, por bloquearem a produção de prostaglandinas, não inibindo a síntese da IL 1 e do fator TNF-alfa, estimulam a produção da ET 1 e do nucleotídeo AMPc, capaz de reduzir a produção do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI), estimulando a fibrinólise, diminuindo a aderência plaquetária; e causando aumento da liberação de histamina pelos mastócitos no local da inflamação.

o que, também, resulta em diminuição da migração dos neutrófilos. Tal efeito, igualmente, sugere a produção mais acentuada das endotelinas.

O acentuado efeito apresentado pela dexametasona e metotrexato, após 3 horas, pode ter sido causado pela inibição das citocinas IL-1 e TNF estimuladoras da produção do óxido nítrico. Além do que, a dexametasona pode diminuir o número de sítios de ligação das endotelinas nos receptores vasodilatadores ETB das células endoteliais os regulando para baixo.

A diminuição do efeito redutor da exsudação plasmática apresentada pelo tenoxicam, após 1 hora, poderia ser explicada como decorrente da estimulação da produção de óxido nítrico, induzida pela ativação da óxido-nítrico-sintase, estimulada pela diminuição da tensão do oxigênio.

7.1.3. MODELO INDUZIDO PELA PARACOCCIDIOIDINA

A estimulação flogística induzida pela paracoccidioidina, apresentou-se menos intensa do que a induzida pela placa microbiana dental e carragenina. Semelhantemente ao que ocorreu no modelo induzido pela placa microbiana dental a subdivisão em fases não é possível, visto que os mediadores químicos da inflamação foram produzidos inas 3 fases.

O efeito apresentado pelos fármacos testados sugeriu a participação dos produtos derivados dos sistemas do complemento, da coagulação, das cininas, e principalmente, do metabolismo do ácido araquidônico via ciclooxygenase.

O efeito discretamente superior apresentado pelos inibidores da ciclooxygenase sinalizou o aumento da produção desses mediadores, particularmente, das prostaglandinas uma hora após a estimulação flogógena.

A diminuição do efeito do tenoxicam e metotrexato sugeriu a participação mais acentuada dos fatores quimiotáticos para neutrófilos às 6 horas.

O aumento da potência apresentada pelo tenoxicam, em relação a inibição da exsudação plasmática, sugere que a paracoccidioidina causa maior liberação do oxigênio no local da inflamação.

7.2. EFEITO ANTIGRANULOMA

7.2.1. ANÁLISE HISTOMÉTRICA RELATIVA

7.2.1.1. ANÁLISE DA DENSIDADE DE VOLUME

A inibição da síntese de prostaglandinas causa inibição da formação do tecido granulomatoso, principalmente, no período compreendido entre 14 e 21 dias.

A inibição da síntese de LTs e IL-1 produziu em relação ao tecido granulomatoso efeito bifásico, dependente do tempo, estimulando a sua formação nos primeiros 7 dias, inibindo-o posteriormente.

O efeito antiinflamatório semelhante apresentado pelo tenoxicam e dexametasona, aos 7 dias, sugere que os dois fármacos apresentam efeito inibidor da produção de LTs e de IL-1, reduzindo mais acentuadamente a quimiotaxia celular para a região supurativa central e diminuindo a sua densidade de volume.

A diminuição da concentração de PGs pelos fármacos testados determinou a diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) nos quatro períodos experimentais.

A diminuição concentração de LTs e PGs promove a diminuição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F), comparativamente ao grupo controle.

O aumento da densidade de volume das fibras colágenas até 21 dias foi estimulada pela diminuição da concentração de PGs no foco inflamatório.

A diminuição concentração de PGs e LTs no foco inflamatório causou a diminuição da densidade de volume ocupada pelas fibras colágenas, indicando a inibição da sua síntese no período compreendido entre 7 e 21 dias.

A concentração mínima de PGs e elevada de LTs aos 28 dias, no tecido granulomatoso, inibiu a formação das fibras colágenas, enquanto que a presença mínima de LTs e PGs estimula a síntese dessas fibras.

A inibição da síntese de PGs inibiu a angiogênese.

A inibição de PGs e LTs apresenta efeito angiogênico bifásico dependente do tempo. Até 7 dias, estimula a angiogênese, inibindo-a após esse período.

7.2.1.1. GRUPO CONTROLE

A densidade de volume ocupado pelo tecido granulomatoso aumentou com diferença não significativa entre os períodos experimentais, possivelmente, decorrente da substituição dos componentes exsudativo e vasculares, inicialmente abundantes nesse tecido, pelos elementos celulares e fibrosos, característicos do processo de maturação.

A região central de necrose supurativa diminuiu gradualmente com o passar do tempo, sendo substituída por tecido granulomatoso.

7.2.1.1.2. TENOXICAM

No período compreendido entre 6 horas e 7 dias o tenoxicam, comparativamente à indometacina, aumentou a potência antiinflamatória, inibindo mais acentuadamente a migração celular para a região central de necrose supurativa.

O efeito antigranuloma do tenoxicam nos primeiros 7 dias, deveu-se a inibição da região central de necrose supurativa, possivelmente, por meio de mecanismos inibidores da síntese de PGs, LTs, IL-1 e de outros fatores quimiotáticos para neutrófilos.

O efeito redutor das fibras colágenas, aproximadamente aos 28 dias e da densidade de volume de macrófagos (NM/F) durante todo o experimento foi responsável, em parte, pela redução da densidade de volume do tecido granulomatoso após 14 dias.

O efeito inibidor das fibras colágenas aos 28 dias, provavelmente, em parte, foi causado pela inibição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F).

O efeito menos acentuado apresentado pelo tenoxicam, comparativamente à indometacina, em relação à inibição do tecido granulomatoso, possivelmente, tenha sido causado pela inibição menos acentuada da vascularização constatada entre 7 e 14 dias.

7.2.1.1.3. INDOMETACINA

Entre 6 horas e 7 dias a indometacina diminuiu a potência inibitória da migração dos neutrófilos não inibindo a região central de necrose supurativa do granuloma.

Apresentou efeito antigranuloma retardado em relação ao tenoxicam, visto que até 7 dias não inibiu a densidade de volume do tecido granulomatoso e da região central de necrose supurativa.

Aos 14 dias a inibição do tecido granulomatoso foi superior à proporcionada pelo tenoxicam, possivelmente, por inibir mais acentuadamente a angiogênese do tecido granulomatoso. Contudo, após esse período apresentou efeito semelhante ao tenoxicam.

7.2.1.1.4. DEXAMETASONA

O fármaco conservou a potência inibitória da migração dos neutrófilos no período compreendido entre 6 horas e 7 dias, inibindo, nesse último período experimental, a densidade de volume da região central de necrose supurativa.

O aumento da densidade de volume do tecido granulomatoso, possivelmente, tenha sido causado pelo estímulo da angiogênese, visto que, ao 7 dias, agiu inibindo a migração dos neutrófilos e diminuindo a densidade de volume dos macrófago (NM/F), sem causar alteração da densidade das fibras colágenas.

Aos 14 dias, a inibição da densidade de volume do tecido granulomatoso pode ter sido causada pela inibição da vascularização do tecido granulomatoso, uma vez que não foi constatada diferença estatisticamente significativa em relação à inibição da densidade de volume dos macrófagos (NM/F) e das fibras colágenas, em relação ao volume total do granuloma.

A inibição da densidade de volume do tecido granulomatoso, aos 14 dias, em parte, pode ter sido causada pela inibição da densidade de volume de macrófagos (NM/F), das fibras colágenas e da vascularização.

Após os 21 dias, a diminuição da inibição do tecido granulomatoso, em parte foi causada pelo aumento da densidade de volume das fibras colágenas e diminuição do efeito inibitório da vascularização, bem como pelo aumento do componente edematoso.

7.2.1.5. METOTREXATO

Das 6 horas aos 7 dias perdeu parte do efeito inibitório da migração dos neutrófilos.

Durante todo o experimento, não reduziu a densidade de volume do tecido granulomatoso. Possivelmente, por apresentar efeito dependente do tempo, tanto estimulador quanto inibidor dos seus diferentes componentes.

O efeito antigranuloma tornou-se mais acentuado, após 21 dias, tendo sido causado pela inibição dos macrófagos (NM/F), fibras colágenas e da vascularização.

O efeito estimulador da produção das fibras colágenas semelhante ao dos antiinflamatórios não esteróides (indometacina e tenoxicam) e o efeito inibidor dessas fibras semelhante ao da dexametasona), indicaram que tais efeitos, respectivamente, foram causados pela inibição da síntese das PGs e pela diminuição da produção de IL-1, consequente ao bloqueio da produção dos LTs.

7.2.2. EFEITO NOS PESOS ÚMIDO, SECO E DIFERENCIAL

Durante todo o processo inflamatório crônico granulomatoso, os quatro medicamentos testados influenciaram o peso úmido, seco e diferencial dos granulomas, reduzindo mais acentuadamente os componentes celulares, fibrosos e edematosos, no período compreendido entre 7 e 21 dias. Após os 21 dias a indometacina e o

metotrexato foram os fármacos que mais inibiram esses componentes, enquanto que a dexametasona apresentou efeito estimulador.

7.2.2.1. RELAÇÃO ENTRE O PESO DOS GRANULOMAS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

7.2.2.1.1. TENOXICAM

A inibição dos pesos úmido, seco e diferencial indicou que o tenoxicam inibiu os componentes celulares, edematosos e fibrosos dos granulomas induzidos pela PMD. Em relação aos componentes celulares e fibrosos, a inibição do peso seco, particularmente, no período compreendido entre 14 e 21 dias pode ter sido decorrente da inibição da densidade de volume do tecido granulomatoso. Em parte esse efeito foi causado pela inibição da proliferação das células mielóides progenitoras dos monócitos/macrófagos e da sua posterior diferenciação e migração em direção ao foco inflamatório, associada a diminuição da vascularização do granuloma. Após 21 dias, concomitantemente com a diminuição da densidade do volume das fibras colágenas perdeu parte do efeito inibitório daqueles componentes não influenciando o peso seco.

A discreta inibição do componente exsudativo (peso diferencial) constatada até 14 dias pode ter sido causada pela redução mínima do edema presente no tecido granulomatoso, bem como do exsudato inflamatório supurativo presente na região central do granuloma. Porém, essa inibição foi mais acentuada na região central, conforme foi demonstrada pela diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. O discreto efeito antiedematoso pode ter sido causado tanto pela diminuição produção de substâncias vasoativas liberadas pelos neutrófilos, decorrente da redução da sua migração para a região central, bem como pela diminuição do oxigênio livre presente no tecido granulomatoso, capaz de estimular a contínua produção do vasodilatador óxido nítrico.

A redução do componente exsudativo dos granulomas pode ter sido causada pela diminuição da densidade do volume dos macrófagos (NM/F) e da vascularização, com a consequente diminuição da produção do óxido nítrico por essas células, tendo ocorrido predominantemente no tecido granulomatoso, uma vez que a densidade do volume da região central aumentou, após 14 dias.

7.2.2.1.2. INDOMETACINA

A indometacina durante todo o experimento inibiu os componentes celulares, fibrosos e edematosos dessas lesões (pesos úmido, seco e diferencial). A diminuição do peso seco, possivelmente, tenha sido decorrente do efeito inibitório da proliferação das células mielóides dos monócitos (NM/F), da posterior quimiotaxia dessas células, bem como da diminuição da vascularização, constatada durante todo o experimento,

associada a diminuição da síntese das fibras colágenas verificada após 21 dias, determinando a diminuição do tecido granulomatoso.

O aumento da densidade de volume da região central do granuloma, comparativamente ao controle, é indicativa de que a redução do componente edematoso somente tenha ocorrido no tecido granulomatoso, tendo sido, possivelmente, motivada pela potencialização do efeito vasoconstritor das endotelinas, bem como pelo mecanismo estimulador do aumento da tensão do oxigênio no local da inflamação, inibindo, consequentemente, a ativação da óxido-nítrico-sintase e a produção do vasodilatador óxido nítrico.

7.2.2.1.3. DEXAMETASONA

A inibição dos componentes celulares, fibrosos e edematosos causado pela dexametasona até 21 dias pode ter sido causada pela inibição da proliferação das células mielóides progenitoras dos monócitos/macrófagos (NM/F); da inibição da sua posterior migração durante todo o experimento; da diminuição da vascularização após 7 dias; e da síntese do colágeno no período compreendido entre 14 e 21 dias.

A redução do componente exsudativo constatado até 7 dias, a exemplo do que ocorreu com o tenoxicam, predominantemente, foi motivada pela inibição do exsudato inflamatório supurativo. Contudo, no período compreendido entre 7 e 21 dias, o efeito inibitório desse componente permaneceu restrito ao tecido granulomatoso, uma vez que, nesse período, constatamos o aumento da região central do granuloma.

O aumento dos componentes celulares, fibrosos e edematosos do granuloma, após 21 dias, possivelmente, tenha sido causado pela diminuição do efeito inibitório da vascularização e do aumento da síntese das fibras colágenas e do edema, tanto no interior do tecido granulomatoso como na região central, causado pela administração prolongada dos corticosteróides.

7.2.2.1.4. METOTREXATO

A diminuição mais acentuada dos componentes celulares e fibrosos proporcionado pelo metotrexato entre 7 e 21 dias, pode ter sido causada pela inibição da proliferação das células mielóides progenitoras dos monócitos/macrófagos e da sua posterior migração (NM/F), constatada durante todo o experimento; pelo efeito inibitório da vascularização constatado após 14 dias; bem como pela redução das fibras colágenas após 21 dias. Logo a seguir, a diminuição do efeito inibitório do peso seco (células e fibras) pode ter sido causada pela diminuição da densidade do volume ocupada pelos macrófagos (NM/F).

Quanto à inibição do componente exsudativo, é possível que o metotrexato por inibir a produção das citocinas ativadoras da óxido-nítrico-sintase inibindo a produção do óxido nítrico e do fator ativador do plasminogênio, tenha inibido a fibrinólise, o aumento da permeabilidade vascular e o edema presente no tecido granulomatoso, uma vez que a densidade de volume da região central, até 21 dias, não apresentou diferença estatisticamente significativa para o grupo controle, tendo, inclusive, após a esse período experimental aumentado de densidade.

7.3. MECANISMO ANTIINFLAMATÓRIO E MODELO EXPERIMENTAL

Em doenças inflamatórias crônicas nas quais haja acentuada participação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico e de outras citocinas liberadas pelos macrófagos, o emprego de antiinflamatórios não esteróides, particularmente, o tenoxicam quando administrados por período prolongado, em decorrência da sua potência antiinflamatória semelhante a da dexametasona e dos efeitos colaterais menos acentuados pode substituir com vantagem a dexametasona e a indometacina.

No tratamento dos processos inflamatórios crônicos nos quais haja a acentuada participação do mecanismo imunológico, a dexametasona por sua propriedade imunomoduladora, inibição da densidade de volume dos macrófagos e da região central de necrose já aos 7 dias, assim como pela acentuada diminuição da densidade do volume do tecido granulomatoso, macrófagos e fibras colágenas proporcionada após esse período experimental, é o mais indicado.

Os antiinflamatórios não esteróides indometacina e tenoxicam apresentaram efeito semelhante, ou seja, ambos interferem na densidade de volume tanto do tecido granulomatoso como da região central do granuloma. Em relação à inibição do tecido granulomatoso esses fármacos diferiram apenas quanto à duração, visto que o tenoxicam apresentou efeito retardado, agindo somente após 14 dias, enquanto que a indometacina, nesse período experimental, já havia reduzido a densidade de volume daquele tecido. Contudo, o tenoxicam apresentou vantagem de inibir, aos 7 dias, a região central de necrose supurativa.

O potente efeito do tenoxicam inibindo mais intensamente a região central de necrose supurativa e apresentando em relação à inibição do tecido granulomatoso efeito semelhante ao da indometacina, bem como efeitos colaterais menos prejudiciais do que os produzidos pela indometacina, sugerem que no tratamento prolongado dos pacientes portadores de processos inflamatórios de longa duração, produzidos por agentes biológicos, nos quais, é contra-indicada a administração dos antiinflamatórios esteróides, a administração desse fármaco é vantajosa em relação ao tratamento com a indometacina.

O metotrexato por sua propriedade antiproliferativa das células mieloides progenitoras dos monócitos/macrófagos e razoável efeito inibidor da densidade de volume do tecido granulomatoso e da região central de necrose, considerando a sua toxicidade, deve ser usado em baixa dose e somente como auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias crônicas.

Fármacos antiinflamatórios, quando administrados por um período de 7 dias, tais como o tenoxicam e a dexametasona, respectivamente, por reduzir a tensão do oxigênio e por potencializar os fatores angiogênicos aumentam a neovascularização, sem inibir a síntese do colágeno, podem ser empregados na terapia regenerativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADOLFHE, M. et al. Etude comparative des effects des PGE1, E2 A2, F1 α , F2 α sur la division des cellules HELA en culture. *Comp. Rend.*, v. 277, p. 537-40, 1973.
2. AHERNE, W. Methods of counting discrete tissue components in microscopically sections. *J. Roy. Micr. Soc.*, v. 87, p. 493-508, 1967.
3. AKAMINE, A. et al. A histochemical study of the behaviour of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *J. Endod.*, v. 20, 474-8, 1994.
4. AKATSU, T. *Determinação das atividades antiinflamatória e antimitótica in vivo dos antiinflamatórios não esteróides ácido mefenâmico, ácido metiazínico e glucametacina*. Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, 1984, (Tese de Mestrado), p. 220.
5. AKATSU, T. *Avaliação das atividades antiexsudativa e antiproliferativa dos antiinflamatórios não esteróides naproxen, ibuprofen, sultindac, glucametacina em modelos inflamatórios produzidos pela inoculação de fragmentos da parede celular de microorganismos da placa dental*. Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, 1994 (Tese de Doutorado), 220 p.
6. AKATSU, T. & CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Comparative effects of non-steroids anti-inflammatory drugs, mefenamic acid, metiazinic acid and glucametacin on the inflammatory response induced by subcutaneous implantation of human dental plaque and on the mitotic activity of isoproterenol stimulated parotid glands of rats. *Cell. molec. Biol.*, v. 32, p. 619-26, 1986.
7. ALLISON, A.C. & DAVIES, P. Increase biochemical and biological activities of molecular phagocytes exposes various stimuli, with special reference to secretion of lysosomal enzymes. In: FURTH, R. V. *Mononuclear Phagocytes In Immunit, Infection and pathology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 487, 1975.
8. ARMITAGE, G. C. Cemento. In: BHASKAR, S. H. *Histologia e embriologia oral de Orban*. 10a ed., São Paulo, Artes Médicas, 1989, cap. 6, p. 191.

*Adaptado das normas para a área biomédica da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) de autoria do grupo de bibliotecários biomédicos da Associação Paulista de Bibliotecários, do World Medical Periodicals, que é a bibliografia protótipo da especialidade e das Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no Documento emanado pelo Conselho Superior do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

9. ASH, P; LOUTIT, J. F.; TOWNSEND, S. M. K. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 283, p. 669-70, 1980.
10. AYANLARBATURMAN, O. et al. Regulation of transforming growth factor- β 1 gene expression by glucocorticoids in normal human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, v. 88, p. 1574-80, 1991.
11. BANNWARTH, B. et al. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Drugs*, v. 47, p. 25-50, 1994.
12. BARLETT, M. R.; UNDERWOOD, P. A.; PARISH, C. P. Comparative analysis of leukocytes, endothelial cells and platelets to degrade subendothelial basement membrane for cytokines and detection of a novel sulfatase. *Immunol. Cell. Biol.*, v. 73, p. 113-24, 1995.
13. BELLIDO, T. et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of androgen receptor. *J. Clin. Invest.*, v. 95, p. 2886-95, 1995.
14. BERESINI, M.H.; LEMPERT, M.J.; EPSTEIN, L.B. Overlapping polypeptide induction in human fibroblast in response to treatment with interferon- γ , interferon- β , interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, v. 140, p. 485-93, 1988.
15. BERTOLAMI, C. N. & BRONSON, R. E. Molecular mechanism of tissue repair. In: NORTON & BURSTONE, Ch. J. *The biology of tooth movement*. Boca Raton, CRC PRESS, 1989, cap. 8, p. 253.
16. BEUSENBERG, F. D. et al. Involvement of eicosanoid in platelet-activating factor-induced modulation of adenil cyclase activity in alveolar macrophages. *J. Lipid. Mediat.*, v. 3, p. 301-9, 1991.
17. BHASKAR, S. N. *Histologia e embriologia oral de Orban*. 10a ed., São Paulo, Artes médicas, 1989, cap. 8, p. 253.
18. BICKEL, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J. Periodont.*, v. 64, p. 456-60, 1993.
19. BLEI, F. et al. Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J. Cell. Physiol.*, v. 155, p. 568-78, 1993.
20. BOGDAN, C. et al. Traces of bacterial lipopolysaccharide suppress IFN-gamma-induced nitric oxide synthase gene expression in primary mouse macrophage. *J. Immunol.*, v. 151, p. 301-9, 1993.

21. BOLAM, J. P. et al. Histamine, 5-hydroxytryptamine, kinins and the anti-inflammatory activity of human plasma fraction in carrageenan-induced paw edema in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 26, p. 434-40, 1974.
22. BONTA, I. L. et al. Cyclic AMP levels and their regulation by prostaglandins in peritoneal macrophages of rats and humans. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 6, p. 547-55, 1984.
23. BOOYSE, F. M.; SEDLAK, B. J.; RAFAELSON JR., M. E. Culture of arterial endothelial cells: characterization and growth of bovine aortic cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, v. 34, p. 825-39, 1975.
24. BAYDOUN, A. et al. Selective inhibition by dexamethasone of induction of NO synthase, but not of induction of L-arginine transport, in activated murine macrophage J774 cells. *Br. J. Pharmacol.*, v. 110, p. 1401-6, 1993.
25. BRUDVIK, P. & RYGH, P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Europ. J. Orthodont.*, v. 16, p. 249-63, 1994.
26. BUSSOLINO, F. et al. Interleukin-1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells. *J. clin. Invest.*, v. 77, p. 2027-33, 1986.
27. CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. *Patologia Básica da cavidade bucal*. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 1982. cap. 7.
28. CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. Papel dos antiinflamatórios não esteróides Ibuprofen, naproxen, sulindac e glucametacina na fisiopatologia dos granulomas inflamatórios *In vivo*: relatório final. Bauru, FOB-USP, 1990 (Proc. FAPESP, n. 87/3024-1).
29. CAWSON, R. A.; BINNIE, W. H.; EVESON, J. W. *Efermidades da boca: correlações clínicas e patológicas*. São Paulo, Artes Médicas, 1995, p. 4.8.
30. CHALKLEY, H. W. A method for the quantitative morphologic analyses of tissue. *J. Nat. Cancer Invest.*, v. 4, p. 47, 1943 apud AHERNE² p. 497.
31. CHABAUD, F. DANNA, M.; BENY, J. L. A vascular smooth muscles nitric oxide relaxation by a mechanism distinct of calcium changes. *Life Sci.*, v. 54, p. 1449-58, 1994.
32. CHOU, S. Y. & PORUSH, J. G. Renal actions of endothelin-1 and endothelin-3 interactions with the prostaglandin system and nitric oxide. *Am J. Kidney Dis.*, v. 26, p. 116-23, 1995.

33. CHYUN, Y. S. & RAISZ, L. G. Stimulation of bone formation by PGE2. **Prostaglandins**, v. 27, p. 97, 1984 apud LORENZO 135 p.198.
34. COLLI, S. et al. Effects of tenoxicam on superoxido anion formation beta-glucuronidase release and fMPL binding in human neutrophils: comparison with other NSAIDs. **Pharmacol. Res.**, v. 23, p.367-79, 1991.
35. COOPER, D. et al. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 3978-82, 1995.
36. COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Pathologic basis of disease**. 4^a ed., Philadelphia, Saunders, 1989, cap.2.
37. COSTA, J. J. et al. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor- α and macrophage inflammatory protein-1 α . **J. Clin. Invest.**, v.91, p. 2673-84, 1993.
38. CRONSTEIN, B. N. Molecular mechanism of methotrexate action in Inflammation. **Inflammation**, v. 16, p. 411-23, 1992.
39. CRONSTEIN, B. N. & NAIME, D; OSTAD, E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an vivo model of inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 2675-82, 1993.
40. DAVID, M.J. et al. Effect of non-steroids anti-inflammatory drugs (NSAIS) on glycosyltransferase activity from human osteoarthritic cartilage. **Br. J. Rheumatol.**, v. 31 (Suppl.), p. 13-7, 1992.
41. DAVIDOVITCH, Z. & SHANFELD, J. L. AMPc levels in alveolar bone of orthodontically treated cats. **Arch Oral Biol.**, V. 20, 567-74, 1975 YAMASAKI, K; SHIBATA, Y.; FUKUHARA, T. The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*macaca fuscata*). **J. dent. Res.**, v. 61, p. 1444-6, 1982.
42. DAVIDOVITCH, Z. et al. Biochemical mediators of the effects of mechanical forces and eletric currents on mineralized tissues. **Calcif. Tiss. Int.**, 1984; 36: 586 apud HARVEY, W. & BENNETT, A. **Prostaglandin in bone resorption**. Florida, Boca Raton, 1989, Cap. 8, p.110.
43. DAVIES, P. et al. Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes. **Nature**, v. 2531, p. 423-25, 1974.

44. DAVIES, P. & ALLISON, A. C. Secretion of macrophages enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation. In: NELSON, D.S. **Immunology of the macrophage**. New York, Academic Press, 1976.
45. DAVIES, P. & BONNEY, R.J. Secretory products of mononuclear phagocytes a brief review. *J. Reticuloend. Soc.*, v. 26, p. 37-47, 1979.
46. DeLUSTRO, F.; SHERER, G.K.; LeROY, E.C. Human monocyte stimulation of fibroblast growth by soluble mediator(s). *J. Reticuloendothel Soc.*, v. 28, p. 519-32, 1980.
47. DETMAR, M. et al. Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells *in vitro*. *J. Invest Dermatol* v. 98, p.147-53, 1992.
48. DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I. K.; KAPLAN, A. M. Effect of macrophages on fibroblast DNA synthesis and proliferation. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, v.169, p. 445-52, 1982..
49. DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-1 induces interleukin-1. Induction of interleukin-1 in rabbits *in vivo* and in human mononuclear cells *in vitro*. *J. Immunol.*, v. 139, p. 1902-10, 1987.
50. DINERMAN, J. L.; LAWSON, D. L.; METHA, J. L. Interactions between nitroglycerin and endothelium in vascular smooth muscle relaxation. *Am. J. Physiol.*, v. 260 H698-701, 1991.
51. DOHERTY, N. S. & ROBINSON, B. V. The inflammatory response to carrageenan. *J. Pharm. Pharmac.*, v. 27, p. 701-3, 1975.
52. DOWES, F.R.; ROBIN, M.; STENDLE, R. Influence of anti-Inflammatory drugs on phagocytes and lysosomes in human granulocytic leukocytes. In: KATONA, G. **Inflammation and anti-Inflammatory therapy**. New York, Spectrum Publications Inc, 1975.
53. DRAKE, W. et al. Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab. Invest.*, v.67, p. 617-27, 1992.
54. DURIEU-TRAUTMANN, O. et al. Nitric oxide endothelin and secretion by brain microvessel endothelial cells: regulation by cyclic nucleotides. *J. Cell. Physiol.*, v. 155, p. 104-11, 1993.
55. EFTIMIADI, C. et al. Divergent effect of the anaerobic bacteria by product butyric acid on the immune response: suppression of T-lymphocyte. *Oral Microbiol Immunol.*, v. 6, p. 17-23, 1991.

56. ELEANOR-WÉIR C. et al. Osteoblast-like cells secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to parathyroid hormone and lipopolysaccharide. *Endoc. Soc.*, v. 124, p. 899-904, 1989.
57. ELEAMUZIE, I. C. & NJOKU, A. C. The role of neutrophils in acute and chronic inflammation in rats. *Afr. J. Med. Sci.*, v. 21, p. 23-8, 1992.
58. EMORI, T.; HIRATA, Y.; MARUMO, F. Endothelin-3 stimulates prostacyclin production in cultured ovine endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 17, Suppl. 7, S140-2, 1991.
59. ENOKIBORI, M.; OKAMURA, T.; TODA, N. Mechanism underlying substance P-induced relaxation in dog isolated superficial temporal arteries. *Br. J. Pharmacol.*, v. 111, p. 72-88, 1994.
60. ESTES, J. E. et al. Macrophage derived growth factor for fibroblasts and interleukin-1 are distinct entities. *J. Leukoc. Biol.*, v. 35, p. 115, 1984 apud KUNKEL; CHENSUE; PHAN.¹²⁵ p.191.
61. FAN, T. P. et al. Stimulation of angiogenesis by substance p and interleukin-1 in the rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, v. 8110, p. 43-9, 1993.
62. FARRAR W.L. & HUMES, J. L. The role of arachidonic acid metabolism in the activities of interleukin 1 and 2. *J. Immunol.*, v. 135, p.1153-9, 1985.
63. FAVALLI, C. et al. The effect of PGA₁ on the immune response in B-16 melanoma-bearing mice. *Prostaglandins*, v. 19, p. 897-904, 1980.
64. FEINMARK, S. J. The role of the endothelial cell in leukotriene biosynthesis. *Am. Rev. Resp. Dis.*, v. 146, p. S51-5, 1992.
65. FELDMAN, S. R. & YAAR, M. Oncogenes. *Arch. Dermatol.*, v. 127, p. 707-11, 1991.
66. FERLUGA, J. et al. Cytolytic effects of the complement cleavage product C3_a Br. J. Cancer, v. 34, p. 626, 1976 apud DAVIES & BONNEY⁴⁵ p. 40.
67. FERRANDIZ, M. L. & FOSTER, S. J. Tumor necrosis factor production in a rat air pouch model of inflammation: role of eicosanoid. *Agent Action*, v. 32, p. 289-94, 1991.
68. FEUERSTEIN, N.; FOEGH, M.; RAMWELL, P. W. Leukotrienes C4 and D4 induce prostaglandin and thromboxane release from rat peritoneal macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, v. 72 , p. 389-91, 1981.

69. FIEREN, M. W. et al. Prostaglandin E2 inhibits the release of the tumor necrosis factor-alpha rather interleukin-1 beta from human macrophages. *Immunol-Lett.*, v. 31, p. 85-90, 1992.
70. FOREMAN, J. & JORDAN, C. Histamine release and vascular changes induced by neuropeptides. *Agents Actions*, v. 13, p. 105-116, 1983.
71. FOWLES, J. R. et al. Glucocorticoid effects on natural and humoral immunity in mallards. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 17, p. 165-77, 1993.
72. FRANK, N. R. Vascular endothelial growth factor - its role in retinal vascular proliferation. *N. Engl. J. Med.*, v. 331, p. 1519-20, 1994.
73. FRIEDMAN, D. et al. The role of nucleotides in the cell cycle. In: GREGGARD, P. & ROBINSON, G. A. (eds). *Advances in cyclic Nucleotide Research*. New York, v.5, 1976, p. 769-1114.
74. FUKUDA, N. et al. Effects of Indomethacin endothelium denudation, methylene blue and L-NG-monomethyl arginine on the vasoactive effects of endothelin-3. *Jpn-J-Pharmacol.*, v. 55, p. 375-80, 1991.
75. FULLER, K. & CHAMBERS, T. J. Generation of osteoclasts in cultures of Rabbit Bone Marrow and Spleen cells. *J. Cell. Physiol.*, v. 132, p. 441-52, 1987.
76. FULLER, K.; GALAGHER, A. G.; CHAMBERS, T. J. Osteoclast resorption - stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Bioch. Bioph. Resesch. Comm.*, v. 181, p. 67-73, 1991.
77. FUJIHASHI, K. et al. Cytokines and periodontal diseases immunopathological role of Interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *J. Periodont.*, v. 64, p. 400-6, 1993.
78. GEE, J. B. L. et al. Elastase secretion by mouse peritoneal macrophage. In: ROSSI, F.; PATRIARCA, P. *Biochemistry and function of phagocytes*. New York, Plenum Press, p. 217, 1982.
79. GLANT, T. T. et al. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J. Bone Miner. Res.*, v. 8, p. 1071-9, 1993.
80. GLASER, K. B. et al. Pharmacological characterization of WAY-121,620: a potent anti-inflammatory Indomethacin-based inhibitor of 5-lipoxygenase (5-LO) phospholipase A2 (PLA2). Wyeth-Ayerst Research, Princeton, NJ 08543 (abstract), 1993.

81. GOSPODAROWICZ, D. & ILL, C. Extracellular matrix and control of proliferation of vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, v. 65, p. 1351-64, 1980.
82. GRASSI-KASSISSE, D. M. et al. Modulation by endogenous prostanoids of the vasoconstrictor activity of endothelin-1 in the canine isolated, perfused spleen. *Br J. Pharmacol.*, v. 113, p. 675-80, 1994.
83. GUALDE, N.; DURGSFRASODORO, A.; GOODWIN, J. S. Effect of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on proliferation of human T cells and T cells subsets. *J. Immunol.*, v. 134, p. 1125-9, 1985.
84. GYETKO, M. R. et al. Monocyte1 alpha-hydroxylase regulation: induction by inflammatory cytokines and by dexamethazone and uremia toxin. *J. Leukoc. Biol.*, v. 54, p. 17-22, 1994.
85. HARREL, J. C. & STEIN, S. H. Prostaglandin E₂ regulates gingival mononuclear cell immunoglobulin production. *J. Periodont.*, v. 66, p. 222-7, 1995.
86. HASCELIK, Z. et al. Effects of tenoxicam neutrophil chemotaxis in rheumatoid arthritic and healthy controls. *Clinic Rheumatol.*, v. 13, p. 98-102, 1994.
87. HAYNES, A. R. & SHAW, R. J. Dexamethasone-induced increase in platelet-derived growth factor (B) mRNA in human alveolar macrophages and myelomonocytic HL60 macrophage-like cells. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, v. 7, p. 198-206, 1992.
88. HARVEY, W. Periodontal disease and osteomyelitis. In: HARVEY, W. & BENNETT, A. *Prostaglandins in bone resorption*. Florida, Boca Raton, 1988, cap. 6. p. 73-89.
89. HASELTON, F. R & ALEXANDER, J. S. Platelets and a platelet released factor enhance endothelial basis. *Amer. Physiol. Soc.*, v. 263, p. L670-L678, 1992.
90. HASSOUN, P. M. et al. Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase/xantine oxidase gene expression by oxygen tension. *Amer. J. Physiol.*, v. 266 p. L163 - L171, 1994.
91. HEATH, J. K. et al. Human gingival tissues in culture synthesize thee metalloproteinases and a metalloproteinases inhibitor. *J. Periodont. Res.*, v. 17, p. 183-90, 1982.
92. HEATH, J. K. et al. Pig interleukin 1 is a potent stimulator of bone resorption in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, v. 37, p. 95-7, 1985.
93. HEATH, J. K. et al. Growth and differentiation factors of pluripotente stem cells. *J. Cell. Sci. (suppl)*, v. 13, p. 75-85, 1990.

94. HENSON, P.M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I-The role antibody and complement on monopagocytatable surface or phagocytasable particles. *J. Immunol.*, v. 107, p.1535-46, 1971.
95. HENSON, P. M. Interation of cells with immune complexes adherence, release of constituents and tissue injury. *J. Exp. Med.*, 134 (suppl.), p. 114s - 35s, 1971.
96. HEYWORTH, C. M. et al. The biochemistry and biology of the myeloid haematopoietic cell growth factors. *J. Cell. Sci. Suppl.*, v. 13, p. 57-74, 1990.
97. HIGGS, G.A.; FLOWER, V.J.; VANE, J.R. A new approach to anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.*, v. 28, p. 1959-61, 1979.
98. HIRASAWA, et al. Induction of neutrophil infiltration by rat chemotatic cytokine and its inhibition by dexamethasone in rats. *Inflammation.*, v. 16, p. 187-96, 1992.
99. HIRAI, S. et al. Fibroblast growth factor-dependent metabolism of hipoxanthin in fibroblast via salvage pathway for purine synthesis in porcine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 35, p. 1695-701, 1993.
100. HOM,DB. & MAISEL, R. H. Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing. *Ann otol Rhinol Laryngol.*, v. 101, p. 349-54, 1992.
101. HOLZINGER, C. et al. Effects of interleukin-1, 2, 4, 6, interferon-gamma and granulocysts/macrophage colony stimulating factor on human vascular endothelial cells. *Immunol-Lett.*, v. 35, p. 109-17, 1993.
102. HONN, K. V.; BOCKMAN, R.; MARNETT, L. V. Prostaglandin and cancer: a review of tumor Initiation. *Prostaglandins*, v. 21, p. 833-64, 1981.
103. HONNA, Y.; KASUKABE, T.; HOZUMI, M. Inhibition of differentiation of cultured mouse myeloid leukemia cells by nonsteroidal antiinflammatory agents and counteraction of the Inhibition by prostaglandin E. *Canc. Reseach.*, v. 39, p. 2190 - 4, 1979.
104. HUGHES-FULFORD, M. et al. Inhibition of DNA synthesis and cycle by prostaglandins Independentement of cyclic AMP. In: HAYASHI, O. & YAMAMOTO, S. *Advances in prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, New York, Reven, v. 15, 1985, p. 401-4.
105. HUMES, J. L. et al. The diminished production of arachidonic acid oxygenation products by elicited mouse peritoneal macrophages: possible mechanisms. *J. Immunol.*, v. 124, P 2110-6, 1980.

106. IDA, R. et al. Prostaglandin-stimulated second messenger signalling in bone-derived endothelial cells is dependent on confluence in culture. *J. Cell. Physiol.*, v. 160, p. 585-95, 1994.
107. JAFARI, H. S. et al. Dexamethasone attenuation of cytokine mediated articular cartilage degradation in experimental lapine haemophilus arthritis. *J. Infect. Dis.* v. 168, p. 1186-93, 1993.
108. JAFFE, R. & SANTORO, M. G. Prostaglandins and cancer. In: Ramwell, P. W.. *The prostaglandin* v. 3, p. 329-51, 1977.
109. JOHNSON, G. & PASTAN, I. Change in growth and morphologic of fibroblasts by prostaglandins. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 47, p. 1357-60, 1971.
110. JOHNSON, H. M. & TORRES, B. A. Peptide growth factors PDGF, EGF, and FGF regulate interferon- γ production. *J. Immunol.*, v. 134, p. 2824-26, 1985.
111. KANTOR, H. S. & HAMPTON, M. Indomethacin in submicromolar concentration inhibits cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature (London)*, v. 276, p. 841-2, 1978.
112. KOSAKA et al. Protein Kinase C-mediated inhibition of cyclin A expression in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 30, p. 991-8, 1993.
113. KASASA, S. & SOORY, M. The influence of insulin-like growth factor (IGF) on C19 steroid conversions by human gingival and in cultured gingival fibroblast. *J. Periodont.*, v. 66, p. 966-72, 1995.
114. KATONA, G. & BLENGIO, J.R. *Inflammation and antiinflammatory therapy*. New York, Spectrum Publications Inc, 1975.
115. KAWADA, N. et al. Interferon gamma modulator production of Interleukin-1 and tumor necrosis factor by murine kupffer cells. *Liver*, v. 11, p. 42-7, 1991.
116. KENDALL, D. A. & FIRTH, J. L. Inositol phospholipid hydrolysis in human brain; adenosine inhibition of the response to histamine. *Br. J. Pharmacol.*, v. 100, 37-40, 1990.
117. KHALIL, N. et al. Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor-beta secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in rat. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 1812-8, 1993.

118. KIRCHHEIMER, J. C. Modulation of receptor bound uro kinase-type plasminogen activator on human monocytes by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Scand. J. Rheumatol.*, v. 22: p. 53-7, 1993.
119. KLEIN, S. et al. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, v. 4, p. 973-82, 1993.
120. KREISLE, R. A. & PARKER, C. Specific binding of leukotriene B₄ to a specific receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, v. 157, p. 628-41, 1983.
121. KREFT, A. et al. Structure activity relationships leading to Way-121,520, a tris aryl-type, indomethacin based, phospholipase A₂ (PLA₂) a biosynthesis inhibitor. *Agents Actions*, v. 39, C33-5, 1993.
122. KRINSKY, N. Mechanism of actions of biological antioxidants *Proc. Soc. Exp. Biol. med.*, v. 200, p. 248-54, 1992.
123. KUCEY, D. S.; CHEUNG, P. Y.; ROTSTEIN, O. D. Platelet-activating factor modulates endotoxin-induced macrophage procoagulant activity by a protein kinase c-dependent mechanism. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 944-50, 1992.
124. KUNG, S. K. & LAU, H. K. Modulation of the plasminogen activation system in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Acta*. v. 1176, p. 113-22, 1993.
125. KUNKEL, S. L.; CHENSUE, S. W.; PHAN, S. H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J. Immunol.*, v. 136, p. 186-193, 1986.
126. KUNKEL, S. L. & CHENSUE, S. W. Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 128, p. 892, 1985 apud KUNKEL; CHENSUE; PHAN ¹²⁵ p. 191.
127. KURIHARA, N. et al. Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. *Blood*, v. 74, p. 1295-302, 1989.
128. LEE, W. Experimental study of the effect of prostaglandin administration on the relationship to method of PGE1 administration. *Amer. J. Orthodont. Dentofac. Orthop.*, v. 98, p. 231-41, 1990.
129. LEONI, P. et al. Secretion of hidrolases by mononuclear phagocytes. In: DEAN, R.T.; JESSUP, W. *Mononuclear phagocytes: physiology and pathology*. Amsterdam, Elsvier, p. 181, 1985.
130. LIM, L. K. et al. Reactive oxygen production arachidonate metabolism and cyclic AMP in macrophages. *Biophys Res. Comm.*, v. 114, p. 549-55, 1983.

131. LINDSKOG, S. & HARMSTROM, L. Evidence in favor of anti-invasion fator in cementun or periodontal membrane of the human teeth. Scand. J. dent. Res., 1980, 88: 161 apud HARVEY, W. & BENETT, A. Prostaglandin in bone resorption, CRCPress, Boca Raton, 1989. Cap. 8, p.104.
132. LOPEZ, A. F. et al. Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. J. Exp. Med., v. 163, p 1085-99, 1986.
133. LOPEZ BELMONTE, J. & WHITTLE, B. J. The involvement of endothelial dysfunction, nitric oxide and prostanoids in the rat gastric microcirculatory responses to endothelin-1. Br. J. Pharmacol., v. 112, p. 267-71, 1994.
134. LORENZO J. A. Comparation of bone-resorting activity in the supernatants from phyto hemagglutin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1. Endocrinol., v.121, p. 1164-70, 1987.
135. LORENZO J. A. The function of cytokines in the regulation of local resorption. Crit. Rev. Immunol., v.11, p. 195-213, 1991.
136. LYN, W. S. et al. Leukocytic chemotaxis. Raven Press. New York, 1978, p. 299-306.
137. LUSCHER, T. F. & WENZEL, R. R. Endothelin and endothelin antagonists pharmacology and clinical implications. Agents Actions-Suppl., v. 45, p. 237-53.
138. MALGOLI, A. et al. Control of cytosolic-free calcium in rat and chickens osteoclasts. The role of extra-cellular calcium and calcitonin. J. Biol. Che., v. 254, p. 14342-47, 1989.
139. MANCUSO, F.; FLOWER, R. J.; PERRETI, M Leukocyte transmigration, but not rolling or adhesion, is selectively by dexamethasone in the hamster post capillary venule. Involviment of endogenous lipocortin 1. J. Immunol., v. 155, p. 377-86, 1995.
140. MANHART, S. S. et al. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. J. Periodont., v. 65, p. 807-13, 1994.
141. MAISEL, R. H. & HOM D. R. Angiogenic growth factors: their effects and potential in soft tissue wound healing. Ann. Otol Laryngol, 349-354, 1992.
142. MASADA, M. P. et al. Measurement of interleukin-1 α and 1- β in crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res., v. 25, p. 156-63.

143. MESSINA, E. J. et al. Role of endothelium-derived prostaglandins in hypoxia-elicited arteriolar dilatation in rat skeletal muscle. *Circa. Res.*, v. 71, p. 790-6, 1992.
144. METCALF, D. & MERCHAV, S. Effects of GM-CFS deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. *J. cell. Physiol.*, v. 112, p. 411-8, 1982.
145. MICHELS, C. et al. Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens role of prostaglandins and bFGF. *Exp. Cell. Res.*, v. 21, p. 43-54, 1994.
146. McALISTER, B. S. et al. The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. *J. Periodont.*, v. 66, p. 429-37, 1995.
147. McGIFF, J. C. & QUILLEY, J. **Prostaglandin act as modulators and mediators in acute illness and injury.** New York, Mccomm, R., Ed., Raven Press, 1982, p.37.
148. MCSHEEDHY, P. M. & CHAMBERS, T. J. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology*, v. 119, p. 1654-9, 1986.
149. MENEZES, M. R. D. & CATANZARO GUIMARÃES, S.A. Determination of anti-inflammatory drugs ibuprofen, diclofenac sodium and fentiazac. *Cell mol. Biol.*, v. 31, p. 455-61, 1985.
150. MEGHJI, S. Bone remodeling. *Br. dent. J.*, v. 172, p. 235-43, 1992.
151. MEIKLE, M. C. et al. Gingival fibroblast degrade type I collagens films when stimulated with tumor and interleukin-1 evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J. Periodont. Res.*, v. 24, p. 207-13, 1989.
152. MILANO, S. et al. Prostaglandin E₂ regulates inducible nitric oxide syntheses in the murine macrophage cell line 1774. *Prostaglandins*, v. 49, p. 105-15, 1995.
153. MONCADA, S. & FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins aspirin like drugs and edema of inflammation. *Nature*, 1973; 246: 217 apud HARVEY, W. & BENNETT, A. **Prostaglandins in bone resorption.** Florida, Boca Raton, 1989.
154. NARAHARA, H.; FRENKEL, R.; JOHNSTON, J. M. Secretion of platelet-activating factor acetylhydrolase following phorbol ester-stimulate differentiation of HL-60 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 301, p. 275-81, 1993.

155. NAKAJIMA, R. A. Bradykinin-induced alveolar inflammation. Contribution of sensory neuropeptides differs according to airway site. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 149, p. 694-8, 1994.
156. NAKAMURA, H. & SHIMIZU, M. *Jap. J. Pharmacol.*, v. 24, p. 393-405, 1974 apud DHOERTY & ROBINSON⁶¹ p. 703.
157. NASSEM, SM; HOLLANDER VP Insulin reversal of growth inhibition of plasma cell tumor by prostaglandin or adenosine 3'5' monophosphate. *Cancer Res.*, v. 33, p. 2909 -12, 1973.
158. NEILSON, E. G.; PHILLIPS, S. M.; JIMENEZ ST ... T Lymphocyte-modulation of fibroblast proliferation... "J. Immunol.", v. 128, p. 1708-14, 1980.
159. NICOSIA, R. F.; NICOSIA, S. V.; SMITH, M. Vascular endothelial growth factor platelet-Derived Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and Insulin-like Growth Factor-1 Promote Rate Aortic Angiogenesis *in vitro*. *Am J. Pathol.*, v. 145, 1023-29, 1994.
160. NORTON, L. A. & BURSTONE, Ch. J. *The biology of tooth movement*. CRCPress, Boca Raton, 1989.
161. ODA, T. & KATORI, M. Inhibition site of dexamethasone on extravasation of polymorphonuclear leukocytes in the hamster cheek pouch microcirculation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 52, p. 337-42, 1992.
162. OEGEMA, T. R. et al. The effects of proteoglycans on the formation of fibrils from collagen solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 170, p. 698-709, 1975.
163. OFFENBACHER, S. ; HEASMAN, P. A.; COLLINS, J. G. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J. Periodont.*, v. 64, p. 432-44, 1993.
164. ORLY, J. & SATO, G. Fibronectin mediates cytokinesis growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell.*, v. 17: 1295-305, 1979.
165. OROPEJA, R.L. & WERB, A. Binding of hormones and other biological messenger to macrophages receptors. In: DEAN, R.; JESSUP, W. *Mononuclear phagocytes: physiology and pathology*. Amsterdam, Elsevier, p. 225, 1985.
166. OTTERNESS, I. G. et al. Inhibition of interleukin-1 synthesis by tenidap: a new drug for arthritis. *Cytokine*, v. 3, p. 277-83, 1991.

167. OVERALL, C. M.; WRANA, J. L.; SODEK, J. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-beta 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J. Periodont. Res.*, v. 26, p. 279-82, 1991.
168. PAGE, R.C.; DAVIES, P.; ALISSON, A.C. Participation of mononuclear phagocytes in chronic inflammatory diseases. *J. Reticuloend. Soc.*, v. 15, p. 413-38, 1974.
169. PAGE, R.C., DAVIES, P.; ALISSON, A.C. Pathogenesis of the chronic inflammatory lesion induced by group A of streptococcal cells walls. *Lab. Invest.*, v. 30, p. 568-81, 1974.
170. PAGE, R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal diseases. *J. Periodont. Res.*, v. 26, p. 230-42, 1991.
171. PANES, J. et al. Effects of tenidap on leukocyte-endothelial cell adhesion in mesenteric venules. *J. Reumatol.*, v. 22, p. 444-9, 1995.
172. PANTALONE, R. & PAGE, R.C. Enzyme production and secretion by lymphokine-activated macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v. 21, p. 343, 1977 apud DAVIES & BONNEY⁴⁵ p. 38.
173. PATERSON, P. & HARWIN, S. M. Suppression of allergic encephalomyelitis in rats by mean of antibrain serum. *J. Exp. Med.*, v. 117, p. 755-73, 1963.
174. PATT, L. M. & HOUCK, J. C. Role of polypeptide growth factors in normal and abnormal growth. *Kidney Int.*, v. 23, p. 603-10, 1983.
175. PELLEGATTA, F. et al. Inducible nitric oxide synthase modulates fibronectin production in the EAhy926 cell line and cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 24, p. 1014-9, 1994.
176. PEPPER, M. S. et al. Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp. Cell. Res.*, v. 204, p. 356-63, 1993.
177. PERTOVAARA, L. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Is Induced in Response to Transforming Growth Factor- β in Fibroblastic and Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 6271-4, 1994.
178. Ponsgri Brudwig & Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Europ. J. Orthodont.*, v. 16, p. 249-63, 1994.

179. PRAJGROD, G. & DANON, A. Biphasic regulation by dexamethasone of IL-1 and LPS-stimulated endothelial prostacyclin production. *Agents Actions*, v. 36 (1-2), p. 270-6, 1992.
180. QWARNSTROM, E. F. et al. Binding internalization and intracellular localization of interleukin-1 β in diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 8261-69, 1988.
181. RADDASSI, K. et al. Arachidonate metabolism trigger in primed macrophage by signals inducing antitumor activity. *J. Lipid. Mediat.*, v. 4, p. 185-98, 1991.
182. RAISZ, L.G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, v. 318, p. 818-28, 1988.
183. RAISZ, L.G. & KREAN, B. E. Regulation of bone formation. *The New Engl. J. Med.*, v. 309 p. 84-9, 1983.
184. RAY, A. & PREFONTAINE, K. E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 752-6, 1994.
185. RAINES, C. S.; TRAUGOTT, U.; STONE, S. M. suppression of chronic allergic allergic encephalomyelitis: relevance to multiple sclerosis. *Science*, v. 201, p. 455, 1978.
186. RASCH, M. S. et al. The effect of initial periodontal therapy on salivary platelet activating factor levels in chronic adult periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 66, p. 613-23, 1995.
187. RIAN, E. Parathyroid Hormone-related Protein is produced by cultured endothelial cells: a possible role in angiogenesis. *Bioch. Bioph. Reseck. Comm.*, v. 198, p. 740-7, 1994.
188. RICHARDS, D. & RUTHERFORD, R. B. The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Arch. Oral Biol.*, 33: 237- 43. 1988.
189. ROBBINS, S. et al. *Pathologic basis of disease*. 4 ed. Philadelphia, Saunders, 1989.
190. ROBISON, T. W. & FORMAN, H. J. Dual effect nitrogen dioxide on rat alveolar macrophage arachidonate metabolism. *Exp. Lung. Res.*, v. 19, p. 21-36, 1993.
191. ROLA-PLESZCZYNSKI, M. & LEMAIRE, I Leucotrienes augment interleukin-1 production by human monocytes. *J. Immunol.*, v. 135, p. 3958-61, 1985.
192. ROSOL, T. J. & CAPEN, C. C. Biology of Disease. Mechanism of cancer -induced hypercalcemia. *Lab. Invest.*, v. 67, p. 680-702, 1992.

193. ROTHE, M.J. & FALANGA, V. Growth factors and wound healing. *Clinics Dermatol.*, v. 9, p. 553-9, 1991.
194. RUBINSTEIN, H. R. et al. Modulation of I-A and I-E expression in macrophages by T-suppressor cells induced in *Cryptococcus neoformans* infected rats. *Mycopathologia*, v. 123, p.141-8, 1993.
195. RUIZ, P. et al. In vivo glucocorticoid modulation of guinea pig splenic macrophage Fc-γ receptor. *J. Clin. Invest.*, v. 88, p. 149-57, 1991.
196. SACERDOTE, P. & PANERAI, A. E. Effect of tenoxicam and indomethacin on the chemotaxis induced by substance P and interleukin-8 on human monocytes and polymorphonuclear cells. *Int. J. Tissue React.*, v. 15, p. 175-80, 1993.
197. SALMON, J.A.; SIMMONS, PM; MONCADA, S. The effects of BW 755C and other anti-inflammatory drugs on eicosanoid concentrations and leukocyte accumulation in experimentally-induced acute inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 35, p. 808-13, 1983.
198. SANDERSON, C. Interleukin-5, Eosinophils an Disease. *J. Amer. Soc. Hematol.*, v. 79, p. 3101-9, 1992.
199. SANTORO, M. G.; PHILPOTT, G. W.; JAFFE, B.M. Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by prostaglandin E. *Nature.*, v. 263, p.: 777-9, 1976.
200. SANTORO, M. G. et al. Modulation of the growth of a human Erytroleukemic cell line (k-562) by prostaglandins: antiproliferative action of Prostaglandin A. *Cancer Research*, 46: 6073-7, 1986.
201. SASAKI, T. Osteoclastic bone resorbing function: an immunocytochemical study. *Dent. Jpn.*, v. 29, p. 5-9, 1992.
202. SCHEINBERG, M.; SANTORO, J.; SANCHES, M. L. Effect of tenoxicam on inflammation and immune cellular function Brazilliam. *J. Med. Biol. Res.*, v. 23, p. 1143-8, 1990.
203. SCHENKELAARS, E. J. & BONTA, T. J. Cyclooxygenase inhibitors promote the leukotrienes C₄ induced release of beta-glucuronidase from rat peritoneal macrophages: prostaglandin E2, suppressor, *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 8, p. 305 -11, 1986.
204. SCHENKELAARS, E. J. & BONTA, T. J. Effects of leukotrienes C₄ on the release of secretory products by elicited population of rat peritoneal macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 86, p. 477-80, 1983.

205. SCHOEDON, G. et al. Regulation of the L-arginine dependent and tetrahydrobiopterin-dependent biosynthesis of nitric oxide in murine macrophages. *Eur. J. Biochem.*, v. 213, p. 833-9, 1993.
206. SCHULTZ, R. M. et al. Prevention of macrophages tumoricidal activities by agents known to increase cellular cyclic AMP cell. *Cell Immunol.*, v. 42, p. 71-8, 1979.
207. SCULLY, C. Phagocytic and killing activity of human blood gingival crevicular and salivary polymorphonuclear leukocytes for oral streptococcus. *J. dent. Res.*, v. 61, p. 636-9, 1982.
208. SENIOR, R. M. et al. Effects of fibrinogen derivates upon the inflammatory response. Studies with human fibrinopeptide. *J. Clin. Invest.*, v. 77, p. 1014-19, 1986.
209. SHAMSUDDIN, M.; HSUEH, W.; SMITH, L. J. Production of leukotrienes and thromboxane by resident and activated rat alveolar macrophages; a possible role of protein kinase. *C. J. Lab. Clin. Med.*, v. 120, p. 434-43, 1992.
210. SHAPIRA, L. et al. Priming effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on superoxide production by neutrophils from healthy and rapidly progressive periodontitis subjects. *J. Periodontol.*, v. 65, p. 129-33, 1994.
211. SIPE, J. D. et al. Modification of proinflammatory by the antirheumatic agents tenidap and naproxen. A possible correlation with clinical acute phase response. *J. Immunol.*, v. 148, p. 480-4, 1992.
212. SLATER, C. & HOUSE, S. D. Effects of nonsteroids anti-inflammatory drugs on microvascular dynamics. *Microvasc. Res.* v. 45, p. 166-79, 1993.
213. SMITHER, R. L.; FAN, T. P. D. PAF antagonist inhibit angiogenesis in rat sponge model. *Exp.*, v. 61, p. 230, 1990 apud FAN et al.⁶¹ p. 48.
214. SMITH, J. B. et al. Effects of indomethacin and prostaglandin E1 on the production of fibronectin and lysozyme by monocyte-derived macrophages in vitro. *J. Clin. Lab. Immunol.*, v. 35, p. 147-53, 1991.
215. SOMERS, S. D. & ERICKSON, K. L. Alteration of tumor necrosis factor- α (alfa) of tumor production by macrophages from mice fed diets high in eicosapentaenoic fatty acids. *Cell Immunol.*, v. 153, p. 287-97, 1994.
216. SPECTOR, W.G. The macrophage in inflammation. *Ser. Haematol.*, v. 2, p. 132, 1970 apud PAGE; DAVIES; ALLISON¹⁶² p. 432.

217. SPECTOR, W. G. & WILLOUGBY, D. A. *J. Path. Bact.*, v. 84, p. 391-403, 1962 apud DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 24, p. 92, 1972.
218. SPECTOR, W. G.; WALTERS, M.; WILLOUGHBY, D. A. The origin of mononuclear cells in inflammatory exudates induced by fibrinogen. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 90: p. 181, 1965 apud MUSSON, R. A. et al. Intracellular levels and stimulated release of lysosomal enzymes from human peripheral blood monocytes and monocyte derived macrophages. *J. Reticuloend. Soc.*, v.20, p. 249-64,1980.
219. STANDIFORD, T. P. et al. Regulation of human alveolar macrophage Interleukin-8 by prostaglandin E2 and dexamethasone. *Am. J. Respir Cell Mol. Bio.*,v. 6, p. 75-81, 1992.
220. STANIMIROVIC, D.B.; McCARRON, R. B.; SPATZ, M. Dexamethasone down-regulates endothelin receptors in human cerebromicrovascular endothelial cells. *Neuropeptides*, v. 26, p. 145-52, 1994.
221. STASHENKO, P. et al. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J. Periodont*, v. 62, p. 504-9, 1991.
222. SUNG, J. M. et al. Radiocontrast media induced endothelin-1 mRNA expression and peptide release in porcine aortic endothelial cells. *J. Form. Med. Assoc.*, v. 94, p. 77-86, 1995.
223. SUZUKI, M. et al. Opposing effects of indomethacin and nordihydroguaiaretic acid on macrophage function and tumor growth. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 65, p. 306-14, 1994.
224. SWIETER, M. et al. Mast cells and their microenvironment: the influence of fibronectin and fibroblasts on the functional repertoire of rat basophilic leukemia cells. *J. Periodont.*, v. 64, p. 492-96, 1993.
225. TAKAHASHI, K. et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont.*, v. 65, p. 147-53, 1994.
226. TAKAHASHI, K. et al. Role of cytokine in the induction of adhesion molecules on cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodont.*, v. 65, p. 230-5, 1994..
227. TAKIGAWA, M. et al. Cytokine-Dependent Synergistic regulation of interleukin-8 production from human gingival fibroblasts. *J. Periodont.*, v. 65, p. 1002-7, 1994.

- 228 TAMAOKI, J. et al. IgE-dependent activation of alveolar macrophages segments neurally mediated contraction of small airways. *Br. J. Pharmacol.*, v. 103, p.1458-62, 1991.
229. TANIGUCHI, I. et al. Effects of NG-monomethyl-L-arginine, indomethacin, and aspirin on the vasodepressor response to low doses of endothelin-1 and endothelin-3 in rats. *Jpn-Cir-J.* v. 58, p. 69-75, 1994.
230. TATAKIS, D. N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J. Periodont.*, v. 64, p. 416-31, 1993.
231. TATRAI, A. et al. Endothelin-1 actions on resorption, collagen and noncollagen protein synthesis, and phosphatidylinositol turnover in bone organ cultures. *Endocrinology*, v. 13, p. 603-7, 1992.
232. TEN CATE, A. R. *Histologia bucal: desenvolvimento estrutura e função*. 2a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988, cap. 15, p.253.
233. TERRAGNO, D. A. et al. Prostaglandins synthesis by bovine mesenteric arteries and veins,. *Cir. Res.* , 36 and 37 (supl. I), 76, 1975 apud HARVEY, W. & BENNETT, A. *Prostaglandin In bone resorption*. Flórida, Boca Raton, 1989, p.59.
234. THERKELSEN, K. et al. Endothelin-1 and cerebral blood flow: influence of hypoxia, hypercapnia and indomethacin on circulating endothelin levels in healthy volunteers. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 54, p. 441-51, 1994.
235. THOMPSON, J. SAKLATVALA, J.; CHAMBERS, T. J. Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J. Exp. Med.*, v. 164, p. 104-12, 1986.
- 236 TSAI J. ; HO Y.P.; CHEU CC Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J. Periodont.*, v. 66, p. 852-9, 1995.
237. UDAKA, K. et al. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, v. 133, p. 1384-7, 1970.
238. UTSUGI, T. & FIDDLER, I. J. Prostaglandin E2 does not inhibit tumoricidal activity adherent tumor cell. *J. Immunol.*, v. 146, p. 2066-71, 1991.
239. VAN ARMAN, C. G. et al. Some details of the inflammation caused yeast and carrageenan. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, v. 150, p. 328-34, 1965.
240. VAN DAELE, P. et al. Effects of adenine nucleotides on proliferation of endothelial cells. *Circ. Res.*, v. 70, p. 82-90, 1992.

241. VAN DE STOLPE, A. et al. Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, v. 8, p. 340-7, 1993.
242. VAN FURTH, R. et al. The regulation of the participation of mononuclear phagocytes in inflammatory responses. In: *Bayer-Symposium VI Experimental Models of Chronic Inflammatory Diseases*, (L.E.Glynn and H.D. Schiumberger, eds.), Springer-Valag, New York, 1975, p. 302.
243. VIEIRA, E. C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. *Bioquímica celular e biologia molecular*. 2a ed., São Paulo, 1991, cap. 16, p. 161.
244. VIGNON, E. et al. In vitro effect of nonsteroids antiinflammatory drugs on proteoglycanase and collagenase activity in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatol.*, v. 34, p.1332-5, 1991.
245. VISCHER, U. M. et al. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of Von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood.*, v. 85, p.3164-72, 1995.
246. ZICHE, M. et al. Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc. Res.*, v. 40, p. 264-78, 1990.
247. WAHL, L. & CORCORAN, M. L. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. *J. Periodont.*, v. 64, p. 467-73, 1993.
248. WAHL, S. M. et al. Role of transforming growth beta in pathophysiology of chronic inflammation. *J. Periodontol.*, v. 64, p. 450-5, 1993.
249. WANG, C. & STASHENKO, P. Characterization of bone-resorption. *J. Endont.*, v. 19, p. 107-11, 1993.
250. WANG, C. & STASHENKO, P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 8: p. 50-6, 1993.
251. WATANABE, K. et al. Interleukin-4 as potent inhibitor of bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 172, p. 1035-41, 1990.
252. WERB, Z. Biochemical actions of glucocorticoids on macrophages in culture. Specific inhibition of elastase, collagenasee and plasminogen activator secretion and effects on their metabolic functions. *J. Exp. Med.*, v. 148, p.1695, 1978 apud DAVIES & BONNEY⁴⁵ p. 40.

253. WERB, Z. & GORDON, S., S. Secretion of specific collagenase by stimulated. *J. Exp. Med.*, v. 142, p. 346, 1975 apud DAVIES & BONNEY⁵² p. 39.
- 254 WEBB, D.R. & NOWOWIEJSKI, I. Mitojen induced changes in lymphocyte prostaglandin level. A signal for the induction of the suppressor cell activity. *Cell Immunol.*, v.41, p. 72-85, 1978.
255. WILHELM, S. M. et al. SV 40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-hDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 1713-21, 1989.
256. WILLIAMS, A. S.; TOPLEY, N.; WILLIAMS, B. D. Effect of liposomally encapsulated MTX-DMPE conjugates upon TNF alpha and PGE2 release by lipopolysaccharide stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1225, p. 217-22, 1994.
257. WILLIAMS, R. C. et al. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar resorption in beagles. *Science*, v. 227, p. 640-2, 1987.
258. WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(ρ -chorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 141, p. 369-76, 1963.
259. WOOD, D. et al. Resolution of factor that enhances the antibody response of T-cell depleted murine splenocytes from several other monocytes products. *Cell Immunol.*, v. 21, p. 88, 1976 apud DAVIES & BONNEY⁴⁵ p.43.
260. WOZNEY, J. M. et al. Growth factors influencing bone development. *J. cell. Sci. (suppl.)* v. 13, p. 149-56, 1990.
261. WREN, A. D.; HILEY, C. R.; FAN, T. P. Endothelin-3 mediated proliferation in wounded human umbilical vein endothelial cells. *Bioch. Bioph. Research. Comm.*, v. 196, p. 369-75, 1993.
262. YAMADA, K. J.; YAMADA, S. S.; PASTAN, I. Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness and contact inhibition of movement to transformed fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 73, p. 1217-21, 1976.
263. YAMASAKI, K.; MIURA, F.; SUDA, T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J. Dent. Res.* v. 59, p. 1635-43, 1980.
264. YAMAMOTO, C. et al. Modulation by endothelin-1 of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 release from cultured human vascular endothelial cells: interaction of endothelin-1 with cytokines. *Biol. Pham. Bull.*, v. 16, p. 714-5, 1993.

ABSTRACT

ABSTRACT

Was studied comparatively the mechanisms of action and the antiinflammatory effect presented by dexamethasone, tenoxicam, indomethacin and methotrexate, in acute and chronic inflammation, induced by agents flagogenous of minim, media and elevated intensity. With the employ of the edemogenic test was verified that the effect presented by nonsteroid antiinflammatory (tenoxicam and Indomethacin), in relation to inhibition of the plasmatic exsudation induced by paracoccidioidin, was more potent than other medicaments tested. Meanwhile, in the inhibition of the acute inflammation caused by carrageenan and dental microbian plaque, methotrexate, dexametasone and Indomethacin were be the most potents pharmcs, respectively. The injection of the dental microbian plaque in the air pouch model induced two experimental granulomas susceptive to the antiinflammatory effects presented by thepharmacs tested that were utilized in the determination of the weights and volume density occupied by the structures presents in periods experimental of 7, 14, 21 and 28 days. With relation the inhibition of the differential, mid and dry weight of the granulomas, metotrexate and dexamethasone followed by Indomethacin and tenoxicam were the most effective pharmcs in decrescent order of potency. The histomorphometric studies of volume density of the granulomatous tissue revealed that Indomethacin reduced more accentuate this structure comparatively to the tenoxicam at 14 days. After this experimental period tenoxicam presented the most potent anti-inflammatory effect. However, without significant statistical difference to indomethacin. Tenoxicam too presented elevated inhibitory effect of volume density of the supurative necrose region (semblabe with the dexamethasone) particularly along to first week. NSAIDs also showed In relation the inhibition of volume density of the collagen effect stimulator (21 days) and inhibitor (28 days), while that dexamethasone revealed contrary effect. The accentuate effect inhibitory of the volume density of macrophages presented by NAIDs was similar to methotrexate, indicating that these pharmcs possibly presented antimitotic effect for progenitors myeloid cells of monocytes/macrophages.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brizolla, 9-75 - PABX (0142) 23 4133 - C.P. 73 - Telex 142314
FOBU FAX (0142) 23 0415 - CEP 17.043-101 - Bauru - Estado de São Paulo - Brasil

PÓS-GRADUAÇÃO

Fone/fax (0142) 23 7720

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada e defendida por
ANTÔNIO BELTRÃO SCHÜTZ
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 27/09/1996

Prof. Dr. ANA MARIA PIRES SOUBHIA
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. TADASHI AKATSU
Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. SEBASTIÃO LUIZ AGUIAR GREGHI
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Dr. EULÁZIO MIKIO TAGA
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Dr. SÉRGIO AUGUSTO CATANZARO-GUIMARÃES
Orientador
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS PEREIRA
Presidente da CPG