

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA CICLOSPORINA A NO MODELO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR, EM CAMUNDONGOS SENSIBILIZADOS

¹ Aluna de Pós-graduação
em nível de mestrado da
Universidade Federal de
Santa Catarina

² Professora do
Departamento de Análises
Clínicas da Universidade
Federal de Santa Catarina

Silvana Virgínia Gagliotti Vigil¹

Tânia Silvia Fröde²

RESUMO

Neste estudo utilizou-se o modelo do lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA 25mg/Kg, s.c.). Neste protocolo experimental os camundongos receberam, 1 h antes do desafio, solução de azul de Evans (25mg/Kg, i.v.) para quantificação do exsudato. Os objetivos deste trabalho foram: 1) Caracterizar o modelo do LBA avaliando-se os leucócitos e a exsudação no fluido broncoalveolar e em tecidos e 2) Avaliar os efeitos da ciclosporina A (CLP) sobre os parâmetros inflamatórios estudados. Camundongos albinos Suíços receberam OVA (50µg+0,8mg Al(OH)₃ + 0,4mL NaCl 0,9%, s.c.) por 21 dias. A última dose (desafio) foi de 50µg/mL, s.c.. O grupo-controle recebeu 0,1 de mL NaCl 0,9% estéril, s.c.. Em outros experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados com CLP (10 mg/Kg, i.p.) 0,5 h antes do desafio. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 24 h após o desafio. Os resultados obtidos foram

Recebido em: 30/01/2005
Aceito em: 12/05/2005

expressos em média ± E.P.M.. As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) e complementados com os testes de Dunnett ou teste “t” de student. Valores de P < 0,05 foram considerados significantes. Nos animais tratados com OVA observou-se aumento dos leucócitos, às custas de mononucleares, e exsudação (P < 0,05). A ciclosporina A inibiu o influxo de leucócitos, às custas de mononucleares, no LBA (P < 0,05) e aumentou a exsudação no rim e no baço (P < 0,01). O modelo do LBA, induzido pela OVA, é um modelo de resposta inflamatória aguda com aumento de leucócitos e exsudação. A ciclosporina A demonstrou efeito antiinflamatório inibindo o influxo de leucócitos no LBA.

PALAVRAS-CHAVE: Leucócitos, inflamação, lavado broncoalveolar, ciclosporina A

ABSTRACT

In this study we used the bronchoalveolar lavage (BAL) model, of sensitized mice with ovalbumin (25mg/Kg, s.c.). To analyze the exudation 1 h before challenge the animals received 0.2 ml of Evans blue dye (25mg/kg, i.v.). The aim of this study were 1) To characterize the BAL model evaluating the leukocyte and exudation in the BAL and tissues, and 2) To analyze the effect of cyclosporine A (CLP) on the inflammatory parameters described before. The Swiss mice received OVA (50µg + 0,8mg Al(OH)3 + 0,4mL NaCl 0.9%, s.c.) for 21 days. The last dose (challenge) of OVA was 50µg/mL s.c. The control-group received 0.1mL of sterile saline (NaCl 0.9%, s.c.). In another set of experiments, different groups of animals received CLP (10mg/Kg, i.p.) 0,5h before challenge. The inflammatory parameters were analyzed 24h after challenge. The results were expressed by mean ± S.E.M.. The statistical differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) and complemented with Dunnett or student t tests. Values of P<0.05 were considered significant. In OVA-treated animals (25mg/Kg, s.c.) we observed a significant increase of leukocytes influx, due to mononuclear migration, as well as exudation (P<0.01). The cyclosporine A (CLP) 10mg/Kg, i.p, inhibited the leukocyte influx, due to mononuclear (P<0.05) and a significant increase of exudation in the BAL and organs (kidney and spleen) (P<0.05). The BAL

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

model induced by OVA promotes an acute inflammatory response with significant increase of leukocytes and exudation. CLP had important anti-inflammatory proprieties, inhibiting priory leukocyte migration into the BAL.

KEY WORDS: leukocytes, inflammation, bronchoalveolar lavage, ciclosporine A

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas caracterizada pela obstrução reversível e inflamação do trato respiratório, hiperreatividade brônquica persistente e remodelamento das vias aéreas (MADDOX; SCHWARTZ, 2002).

Esta doença atinge em torno de 5 a 10% da população (SHAW et al., 2002) e sua incidência vem aumentando significativamente nos últimos 20 anos em países desenvolvidos (BJERMER, 2001; MADDOX; SCHWARTZ, 2002).

A etiologia da asma é complexa, multifatorial e envolve a interação entre fatores genéticos e estímulos do meio ambiente. Estudos recentes sugerem que estes fatores colaboram para o desenvolvimento de uma resposta imune mediada predominantemente pela ativação de linfócitos TH2 (MADDOX; SCHWARTZ, 2002). A resposta inflamatória na asma envolve diferentes células, como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T, além das moléculas de adesão, fatores de crescimento e mediadores da inflamação, como citocinas, quimiocinas, entre outras (SHAW et al., 2002; BARNES; ADCOCK, 2003).

A asma pode ser desencadeada em conseqüência da inalação de poeira doméstica, polens, pêlos, fumaças, pó de giz, odores fortes, aerossóis químicos, alteração de temperatura, distúrbios emocionais, hiperventilação (riso, choro), exercício físico, infecções virais, uso de aspirina e outros fármacos antiinflamatórios não-hormonais, entre outros. A exposição a alérgenos, particularmente nos primeiros anos de vida, pode determinar inflamação crônica nas vias aéreas de indivíduos geneticamente suscetíveis (WINTHER et al., 2000). Outros fatores de risco para o desenvolvimento da resposta inflamatória nesta doença são: infecções virais na infância, exposição ambiental à fumaça do tabaco, poluição atmosférica e dietas com baixos teores de antioxidantes (LUX et al., 2000).

Na resposta inflamatória que ocorre na asma brônquica, uma reação denominada precoce ou imediata se manifesta por aumento da resistência das vias aéreas, 10 a 15 minutos após contato com o alérgeno nos pacientes asmáticos. Neste estágio a obstrução brônquica é reversível espontaneamente ou por meio de inalação de um broncodilatador. Imediatamente após a inalação do alérgeno, os mastócitos da mucosa das vias aéreas sensibilizados pela μgE são ativados pelo acoplamento do antígeno aos receptores μgE na superfície de sua membrana celular (BJERMER, 2001). Desta forma, ocorre a ativação e a desgranulação dos mastócitos liberando vários mediadores como, por exemplo: histamina, heparina, triptase, quimase, carboxipeptidase, catepsina G, citocinas (Interleucinas – IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α), entre outras (SWYSTUN et al., 2000; WILLS-KARP, 2000). Os mediadores lipídicos (leucotrienos – LTC₄, LTD₄ e LTE₄ e prostaglandina PGD₂) são também sintetizados e liberados após a desgranulação dos mastócitos, pelo metabolismo do ácido araquidônico. No lavado broncoalveolar, de pacientes com asma, ocorre aumento das concentrações principalmente de triptase, histamina, LTC₄, LTD₄, LTE₄, PGD₂, PGF₂ (alfa, beta) e tromboxano, todos potentes broncoconstritores, e que determinam também aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de muco e estimulação nervosa aferente (BARNES et al., 1998; NADEL; BUSSE, 1998).

O modelo experimental do lavado broncoalveolar induzido pela OVALBUMINA (OVA) mimetiza o que ocorre na asma brônquica, em humanos. Nesta doença ocorre uma resposta inflamatória importante em nível pulmonar o que determina a lesão de caráter irreversível e que muitas vezes os medicamentos atuais não são eficazes (NIJS et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que fármacos imunossupressores, do tipo metrotexato e ciclosporina A, em doses menores que as utilizadas para imunossupressão em transplantes, possui importante efeito antiinflamatório e podem ser úteis para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a asma brônquica (DALMARCO et al., 2004).

A resposta das vias aéreas à provocação antigênica é utilizada particularmente para o estudo e a compreensão da patogênese da inflamação, na asma (SCHWEIGERT et al., 2000).

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: 1) Avaliar a resposta inflamatória da OVA em camundongos estudando-se o influxo de leucócitos e a exsudação no lavado broncoalveolar (LBA) e em tecidos (pulmão, rins, coração, baço e fígado); 2) Avaliar os efeitos da ciclosporina A (CLP) sobre os parâmetros inflamatórios estudados neste modelo experimental.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Neste modelo experimental utilizou-se camundongos albinos Suíços de 2 meses de idade de ambos os sexos, pesando entre 25-30 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O estudo realizado foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais pela Universidade Federal de Santa Catarina sob protocolo números: 056/CEUA e 23080.001032/2001-74.

Técnicas Utilizadas

- Indução da Inflamação

Neste protocolo experimental, cada animal recebeu uma dose de 50 µg de ovalbumina (OVA) e 0,8 mg de hidróxido de alumínio (Al (OH)₃) dissolvidos em 0,4 mL de salina estéril (NaCl 0,9%) que foi administrada por via subcutânea (s.c.) (AMORIM, et al., 1993; KIPS et al., 1996). No 14º dia, diferentes grupos de animais receberam novamente a mesma dose de OVA. No 21º dia, os camundongos receberam solução salina estéril (NaCl 0,9%) ou o agente flogístico: OVA (50 µg/mL, s.c.) (AMORIM, et al., 1993; KIPS, et al., 1996). Estes animais foram sacrificados por deslocamento cervical 0,5 h após a administração do agente flogístico. Após sacrifício dos animais foi realizada a lavagem broncoalveolar utilizando-se 0,2 mL de solução salina tamponada estéril (PBS)-heparinizada (20 IU/mL): (PBS: pH 7.6: composição em mmol: NaCl 137, KCl 2.7 e tampão fosfato 10) com auxílio de seringa de 1 mL. As alíquotas do lavado foram coletadas para a quantificação dos números total e diferencial de células, bem como a exsudação.

Contagem Total e Diferencial dos Leucócitos no Lavado Broncoalveolar de Animais Sensibilizados

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e lavagem do lavado broncoalveolar, 200 µL da amostra foram reser-

vados para a contagem celular total, em câmara de Neubauer utilizando-se líquido de Türk, e para a realização de esfregaços celulares. Para contagem diferencial celular foram realizados esfregaços em citocentrífuga (cytopro® cytocentrifuge, Wescor, E.U.A.). Estes foram corados com a solução de May-Grunwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 800 vezes) contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos por número total de células ($\times 10^5$).

Determinação do Exsudato no Lavado Broncoalveolar

Nos animais tratados com OVA, após a coleta do lavado broncoalveolar com solução PBS, uma alíquota (500 μ L) foi separada e congelada em freezer (-20°C) para posterior determinação dos níveis de azul de Evans. No dia dos experimentos, amostras de um mesmo protocolo experimental foram descongeladas à temperatura ambiente e as concentrações do corante foram determinadas em Leitor de Elisa (Organon Teknika, Microwell system, E.U.A.), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 600 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01-50 μ g/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, com auxílio da equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em μ g/mL.

Determinação da permeabilidade vascular em tecidos

Para avaliar a permeabilidade vascular em diferentes órgãos, inicialmente foram determinados os seus respectivos pesos (pulmão, fígado, coração, baço e rim) em gramas. Depois de repetidas lavagens, em solução PBS e remoção dos tecidos adjacentes, os tecidos foram cortados em fatias e transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de formamida. As amostras foram incubadas em banho-maria (45°C) durante 72 h para posterior quantificação dos níveis de azul de Evans. Decorrido o período de incubação, os tubos de ensaio foram centrifugados (20 min, 50 x g) e os sobrenadantes foram transferidos para cuvetas para medida das concentrações do azul de Evans. Para tal, utilizou-se curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01-50 μ g/mL) que tiveram também suas densidades óticas determinadas,

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

com auxílio da equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido.

Protocolo Experimental

- Efeito da Ciclosporina A sobre os níveis de leucócitos e exsudação no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados

Neste protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram tratados 0,5h antes do desafio (OVA: 50 $\mu\text{g/mL}$, s.c.) com ciclosporina (CLP) (10 mg/kg, i.p.). A análise dos parâmetros analisados (contagem de leucócitos e exsudação) foi avaliada 24 h após a administração do agente flogístico.

Neste grupo de experimentos os animais receberam 1 h antes da indução da inflamação 0,2 mL de solução azul de Evans (25 mg/Kg, i.v.). Decorridas 24 h após a administração de OVA, estes animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o exsudato coletado para avaliação dos leucócitos totais e diferenciação celular, bem como exsudação. Vale a pena ressaltar que as doses do fármaco em estudo foram escolhidas com base em trabalhos anteriormente publicados por DALMARCO et al., 2004, pelo qual demonstraram ser esta a dose do fármaco que possui efeito antiinflamatório em modelos de inflamação em animais.

Efeito da Ciclosporina A sobre a permeabilidade vascular em tecidos de camundongos sensibilizados

Para avaliar a permeabilidade vascular em tecidos (fígado, rim, coração, baço e pulmão), os animais receberam solução de azul de Evans (25 mg/Kg, 0,2 mL, i.v.) 1 h antes do desafio. A seguir, estes foram tratados com ciclosporina A (10 mg/Kg, i.p.) 0,5 h antes do desafio. Após 24 h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a exsudação foi analisada. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido úmido.

Fármacos e Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: azul de Evans (Merck, Brasil); Ovalbumina (Sigma, EUA); Ciclosporina A

(R.P. Scherer AmbH, Alemanha); May-Grünwald (Newprov, Brasil); Giemsa (Labclin, Brasil); Líquido de Türk (Newprov, Brasil); Solução Tampão Fosfato (PBS) (pH 7,6, composição: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10 mM) e solução salina estéril (NaCl, 0,9%) de diferentes fontes comerciais. No dia dos experimentos todos os fármacos e reagentes foram diluídos em solução de PBS, em temperatura ambiente.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos por meio da média \pm E.P.M.. Os resultados foram avaliados através de testes paramétricos (ANOVA) e complementados quando necessário pelos testes Dunett ou teste t de student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Nos animais sensibilizados com ovalbumina (OVA) observou-se: aumento significativo do número de leucócitos totais ($\times 10^5$) no LBA ao compararmos com os animais tratados com solução salina estéril (C: $0,88 \pm 0,3$, OVA: $1,20 \pm 0,1$) ($P < 0,05$) (FIGURA 1A). Além disso, este aumento de leucócitos ocorreu às custas de mononucleares ($\times 10^5$) (C: $0,87 \pm 0,3$, OVA: $1,18 \pm 0,1$) ($P < 0,05$) (FIGURA 1B). Nos animais tratados com ciclosporina A (CLP) observou-se diminuição significativa de leucócitos totais ao compararmos com o grupo de animais sensibilizados ($\times 10^5$) (OVA: $1,20 \pm 0,1$, CLP: $0,68 \pm 0,2$) ($P < 0,05$) (FIGURA 1A) e esta diminuição ocorreu devido ao decréscimo do influxo de mononucleares ($\times 10^5$) (OVA: $1,18 \pm 0,1$; CLP: $0,57 \pm 0,1$) ($P < 0,05$) (FIGURA 1B). Neste mesmo protocolo experimental observou-se também aumento da exsudação no LBA ($\mu\text{g/mL}$) nos animais tratado com OVA (C: $1,51 \pm 0,4$, OVA: $6,52 \pm 0,9$) ($P < 0,01$) (FIGURA 1C). Por outro lado, não foi observado diminuição significativa da exsudação no LBA nos animais tratados previamente com ciclosporina A quando comparamos este ao grupo de animais sensibilizados (OVA: $6,52 \pm 0,9$; CLP: $6,48 \pm 0,7$) ($P > 0,05$) (FIGURA 1C). Ao analisarmos a exsudação tecidual observamos que a OVA promoveu aumento

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

deste parâmetro inflamatório nos pulmões ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) em relação aos animais tratados com salina estéril (pulmão: C: $6,92\pm 0,3$, OVA: $9,42\pm 0,28$) ($P < 0,05$) (FIGURA 2A), mas não no rim (C: $6,04\pm 0,7$; OVA: $8,24\pm 1,5$) ($P > 0,05$) (FIGURA 2B) nem no baço (C: $8,88\pm 0,7$; OVA: $10,88\pm 0,9$) ($P > 0,05$) (FIGURA 2C). Nos outros tecidos analisados (fígado e coração), não foram observados resultados significativos nos animais sensibilizados com a OVA (resultados não apresentados). Além disso, a ciclosporina A (CLP: 10 mg/Kg, i.p.) promoveu um aumento significativo da exsudação no rim ($\mu\text{g/g}$ de tecido úmido) (OVA: $7,92\pm 0,5$; CLP: $11,00\pm 0,5$) ($P < 0,05$) (FIGURA 2B) e no baço (OVA: $10,88\pm 0,9$; CLP: $13,26\pm 1,0$) ($P < 0,05$) (FIGURA 2C), mas não no pulmão (OVA: $9,42\pm 0,3$; CLP: $8,47\pm 0,7$) ($P > 0,05$) (FIGURA 2A) quando comparamos estes resultados com o grupo de animais sensibilizados com OVA.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho contribuem significativamente para ampliar os conhecimentos acerca do mecanismo de ação relacionada com o processo inflamatório das vias aéreas. No caso específico os resultados do presente estudo demonstram que no modelo experimental utilizado, nos animais tratados com ovalbumina (OVA), ou seja, sensibilizados com este agente flogístico, houve um aumento significativo da exsudação no lavado broncoalveolar. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pelo qual tem sido observado aumento da exsudação neste modelo experimental (DA CUNHA et al., 2001; NIJS, et al., 2003). Além disso, este modelo de inflamação mimetiza o que ocorre na asma brônquica, em humanos. Nesta doença ocorre uma resposta inflamatória importante em nível pulmonar caracterizada por uma lesão de caráter reversível com o uso de antiinflamatórios (NIJS et al., 2003).

Em nossos resultados observou-se que a ovalbumina (OVA) foi capaz de induzir não só a exsudação no lavado broncoalveolar, mas também em tecidos. Além disso, neste modelo experimental, observamos também aumento significativo da exsudação nos pulmões de camundongos tratados com OVA, o que revela, e confirma mais, uma resposta inflamatória sistêmica (SAITO et al.; 2001; 2002; OKUNUKI et al., 2003).

O uso de imunossupressores como a ciclosporina A promoveu diminuição significativa dos leucócitos, às custas de mononucleares, no lavado broncoalveolar de animais tratados com ovalbumina (OVA). Estes resultados revelam o efeito antiinflamatório deste imunossupressor. Estudos têm demonstrado o efeito da ciclosporina A na inibição da migração celular, agindo principalmente sobre a expressão de moléculas de adesão do tipo integrinas CD11b/CD18 (ARTZ et al., 2003). Visto que a CLP promoveu inibição do influxo de leucócitos neste modelo experimental, podemos supor que este efeito tenha sido sobre a inibição da expressão das moléculas de adesão. Outros estudos têm sido também comentados a respeito do papel antiinflamatório da ciclosporina A. Este fármaco tem mostrado inibir mediadores da inflamação como, por exemplo, a ciclooxigenase-2 (COX-2), o óxido nítrico (NO) e mesmo o fator de transcrição nuclear NF-Kappa B, importante fator de transcrição implicado em diversas doenças inflamatórias de caráter agudo e/ou crônico (RIOJA et al., 2002).

Ao estudarmos a exsudação local e sistêmica verificamos que a CLP não foi efetiva em inibir a exsudação em tecidos, principalmente no rim e no baço. O óxido nítrico é um dos principais mediadores envolvidos na inflamação, principalmente na exsudação. Esta afirmativa pode ser mencionada, pois trabalhos revelam o papel do óxido nítrico em outros modelos de inflamação, como, por exemplo: no edema de pata induzido pela carragenina, em ratos (KATAOKA et al., 2002), na inflamação neurogênica induzida pelo óleo de mostarda, no edema de pata em ratos (LIPPE et al., 1993), além da inflamação crônica demonstrada no modelo de artrite induzida pela carragenina, em ratos (KANE et al, 2004). Outro mediador importante, também relacionado à exsudação, é a histamina. Estudos relatam que esse mediador liberado dos mastócitos exerce papel importante no aumento da permeabilidade vascular, no sítio do processo inflamatório (LIU et al, 2004; SHAKOORY et al, 2004). Todavia os resultados obtidos com a CLP permitem também sugerir que este fármaco não atua diretamente na liberação destes mediadores, neste modelo experimental, uma vez que não observamos inibição da exsudação nem em nível local, nem sistêmico. Desta forma podemos esclarecer o porque este imunossupressor ter aumentado a exsudação nos tecidos.

Em conjunto os resultados até agora apresentados demonstram o envolvimento de múltiplos mediadores liberados na resposta inflamatória a ovalbumina e os diferentes mecanismos de ação antiinflamatória da CLP, sobre os níveis de leucócitos e/ou da exsudação.

No futuro, a confirmação dos resultados alcançados com experimentos complementares servirá para orientar novos estudos sobre a atividade antiinflamatória da CLP.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
 Virgínia Gagliotti;
 FRODE, Tânia
 Silvia. Efeito anti-
 inflamatório da
 ciclosporina A no
 modelo do lavado
 broncoalveolar, em
 camundongos sen-
 sibilizados.
Salusvita, Bauru,
 v. 25, n. 2,
 p. 115-130, 2006.

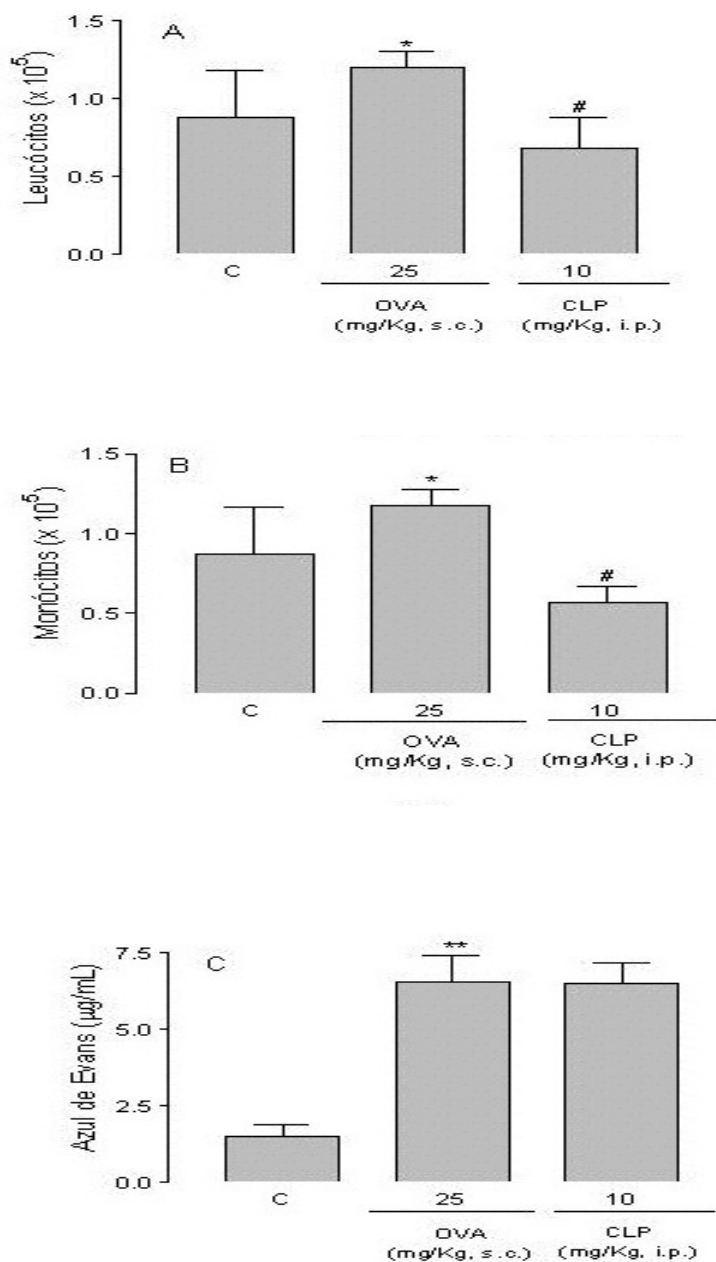


FIGURA 1- Efeito da ciclosporina A (CLP: 10 mg/Kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do desafio em animais sensibilizados com OVA (Ovalbumina: 25 mg/Kg, s.c.) sobre: A) Leucócitos, B) Mononucleares, C) Exsudação. C = animais tratados com salina estéril (NaCl 0,9%) via s.c. OVA = animais tratados com Ovalbumina: 25 mg/Kg, s.c. CLP = animais tratados com ciclosporina A 0,5h antes do desafio. Cada coluna representa a média de 4-6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. * P < 0,05 diferenças estatísticas entre os grupo C e OVA, # P < 0,05 diferenças estatísticas entre os grupos OVA e CLP.

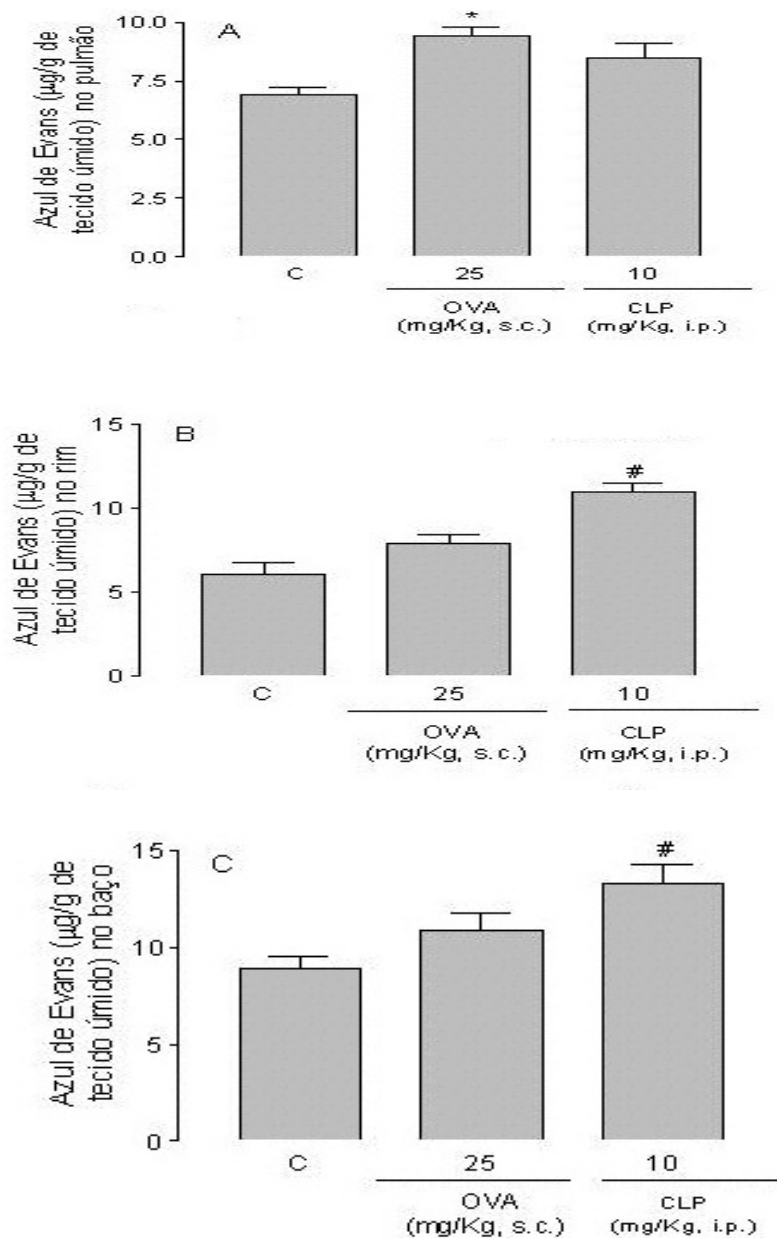


FIGURA 2– Efeito da ciclossporina A (CLP: 10 mg/Kg, i.p.) administrada 0,5 h antes do desafio em animais sensibilizados com OVA (Ovalbumina: 25 mg/Kg, s.c.) sobre a permeabilidade vascular em diferentes órgãos: A) Pulmão, B) Rim e C) Baço. C = animais tratados com salina estéril (NaCl 0,9%) via s.c. OVA = animais tratados com Ovalbumina: 25 mg/Kg, s.c.. CLP = animais tratados com ciclossporina A 0,5 h antes do desafio. Cada coluna representa a média de 4-6 animais e as barras verticais o erro padrão da média.* $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os grupo C e OVA, # $P < 0,05$ diferenças estatísticas entre os grupos OVA e CLP.

VIGIL, Silvana
 Virgínia Gagliotti;
 FRODE, Tânia
 Silvia. Efeito anti-
 inflamatório da
 ciclossporina A no
 modelo do lavado
 broncoalveolar, em
 camundongos sensi-
 bilizados.
Salusvita, Bauru,
 v. 25, n. 2,
 p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

CONCLUSÃO

Com base na observação dos resultados obtidos, podemos concluir que neste modelo experimental ocorre aumento da exsudação, em nível local e sistêmico, e que a ciclosporina A apresentou efeito antiinflamatório agindo principalmente sobre a inibição do influxo de leucócitos no local da inflamação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. AMORIM, C. Z., CORDEIRO, B. B., VARGAFTIG, B. B. Involvement of platelet activating factor in death following anaphylactic shock in boosted and unboosted mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 235, n. 1, p. 17-22, 1993.
2. ARTZ, M. A.; STEENBERGEN, E. J.; HOITSMA, A. J.; MONNENS, L. A.; WETZELS, J. F. Renal transplantation in patients with hemolytic uremic syndrome: high rate of recurrence and increased incidence of acute rejections. *Transplantation*, v. 76, n. 5, p. 821-826, 2003.
3. BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.*, v. 50, n.4, p. 515-596, 1998.
4. BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. How Do Corticosteroids Work in Asthma? *Annals of Internal Medicine*, v. 139, n. 5, p. 359-370, 2003.
5. BJERMER, L., History and future perspectives of treating asthma as a systemic and small airways disease. *Respiratory Medicine*, v. 95, p. 703-719, 2001.
6. DA CUNHA, F. M.; FRODE, T. S.; MENDES, G. L.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CAL-

- IXTO, J. B. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of sesquiterpene polygodial. *Life Sci*; v. 70, n. 2, p. 159-69, 2001.
7. DALMARCO, E. M.; FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S., Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transplant Immunology*, v. 12, n. 2, p. 151-157, 2004.
 8. KANE, D. J.; LOCKHART, J.; MANN, C.; BALINT, P. V.; FERRELL, W.; MCINNES, I. B. Protective Effect Of Sensory Denervation In Inflammatory Arthritis. (Evidence of Regulatory Neuro-Immune Pathways In The Arthritic Joint). *Ann Rheum Dis*, v. 21, 2004.
 9. KATAOKA, H.; HORIYAMA, S.; YAMAKI, M.; OKU, H.; ISHIGURO, K.; KATAGI, T.; TAKAYAMA, M.; SEMMA, M.; ITO, Y. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of hydroxylamine and related compounds. *Biol Pharm Bull*, v. 25, n. 11, p.1436-1441, 2002.
 10. KIPS, J. C.; BRUSSELLE, G. J.; JOOS, G. F.; PELEMAN, R. A.; TAVERNIER, J. H.; DEVOS, R. R.; PAUWELS, R. A. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 153, n. 2, p. 535-539, 1996.
 11. LIPPE, I. T; STABENTHEINER, A; HOLZER, P. Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 232, n. 1, p. 113-120, 1993.
 12. LIU, R. L.; LIU, Z. L.; LI, Q.; QIU, Z. M.; LU, H. J.; YANG, Z. M.; HONG, G. C. The experimental study on the inhibitory effect of tripterine on airway inflammation in asthmatic mice. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, v. 27, n. 3, p. 165-168, 2004.
 13. LUX A. L, HENDERSON A. J, POCOOCK S. J. Wheeze associated with prenatal tobacco smoke exposure: a prospective, longitudinal study. ALSPAC Study Team. *Arch Dis Child*, v. 83, n. 4, p. 307-312, 2000.
 14. MADDOX, L.; SCHWARTZ D. A. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.* v. 53, p. 477-498, 2002.
 15. NADEL, J. A; BUSSE, W. W. Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 157, n. 4, p.130-138, 1998.
 16. NIJS, J.; BECKER, P.; De MEIRLEIR, K.; DEMANET, C.; VINCKEN, W.; SCHUERMANS, D.; MCGREGOR, N.

VIGIL, Silvana
 Virgínia Gagliotti;
 FRODE, Tânia
 Silvia. Efeito anti-
 inflamatório da
 ciclosporina A no
 modelo do lavado
 broncoalveolar, em
 camundongos sen-
 sibilizados.
Salusvita, Bauru,
 v. 25, n. 2,
 p. 115-130, 2006.

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.

- Associations between bronchial hyperresponsiveness and immune cell parameters in patients with chronic fatigue syndrome. *Chest.*, v. 123, n. 4, p. 998-1007, 2003.
17. OKUNUKI H, TESHIMA R, HARIKAI N, SAKAI S, AKIYAMA H, MAITANI T, SAWADA J., Oral sensitization of W/W(v) mice with ovalbumin and possible involvement of the decrease in gammadelta-T cells. *Biol Pharm Bull*, v. 26, n. 9, p. 1260-1265, 2003.
 18. RIOJA, I.; TERCENIO, M. C.; UBEDA, A.; RIGUERA, R.; QUINTELA, J. M.; ALCARAZ, M. J. A new ditriazine inhibitor of NF- kappa B modulates chronic inflammation and angiogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 365, n. 5, p. 357-364, 2002.
 19. SAITO H, HOWIE K, WATTIE J, DENBURG A, ELLIS R, INMAN MD, DENBURG JA. Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology*, v. 104, n. 2, p. 226-234, 2001.
 20. SAITO H, MATSUMOTO K, DENBURG AE, CRAWFORD L, ELLIS R, INMAN MD, SEHMI R, TAKATSU K, MATTHAEI KI, DENBURG JA. Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: a study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J Immunol.*, v. 168, n. 6, p. 3017-3023, 2002.
 21. SCHWEIGERT, M. K.; MCKENZIE. D. P.; SARLO, K. Occupational asthma and allergy associated with the use of enzymes in the detergent industry-a review of the epidemiology, toxicology and methods of prevention. *Clin. Exp. Allergy*, v. 30, n. 11, p. 511-518, 2000.
 22. SHAKOORY, B.; FITZGERALD, S. M.; LEE, S. A.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J Interferon Cytokine Res.*, v. 25, n. 5, p. 271-281, 2004.
 23. SHAW, R. J.; DJUKANOVIC, R.; TASHKIN, D. P.; MILLAR, A. B.; DU BOIS, R. M.; CORRIS, P. A. The role of small airways in lung disease. *Respiratory Medicine*, v. 96, n. 2, p. 67-80, 2002.
 24. SWYSTUN, V. A.; GORDON, J. R.; DAVIS, E. B.; ZHANG, X.; COCKCROFT, D. W. Mast cell tryptase release and asthmatic responses to allergen increase with regular use of salbutamol. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 106, n. 1, p. 57-64, 2000.

25. WILLS-KARP, M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology*, v. 48, p. 263-268, 2000

VIGIL, Silvana
Virgínia Gagliotti;
FRODE, Tânia
Silvia. Efeito anti-
inflamatório da
ciclosporina A no
modelo do lavado
broncoalveolar, em
camundongos sen-
sibilizados.
Salusvita, Bauru,
v. 25, n. 2,
p. 115-130, 2006.