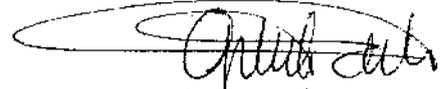


Este exemplar corresponde
à versão final da Tese de Mestrado
de apresentação à Faculdade
de Ciências Médicas da UNICAMP
pela aluna Aurora Santana de
Caticha.

Campinas, 06 de dezembro de 1990.



Prof. Dr. Gilberto de Nucci
-Orientador-

Pleurisia e Edema de Pulmão Induzidos por Policátions

BC/ANCC/102

Aurora Santana de Caticha

Dezembro, 1990

**Tese de Mestrado Realizada no Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas,
Unicamp, sob a orientação do Prof. Dr. Gilberto de Nucci**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pela orientação recebida nesta tese e pelos sábios conselhos sobre a vida.

Ao Prof. Dr. Mário Mariano pela orientação referente a histologia e à discussão geral desta tese.

A Profa. Dra. Júlia Franceschi pela orientação na confecção desta tese e pelo exemplo de dedicação aos alunos de farmacologia.

Aos pós-graduandos Dr. Stephen Hyslop, Susana Rabello e Marcelo Muscara pela realização dos radioimunoensaios desta tese.

A Edson Antunes pela orientação técnica e amizade oferecidos durante a realização desta tese.

Aos amigos pós-graduandos do Departamento de Farmacologia.

Ao laboratório Zambon, pela viagem oferecida ao Royal College of Surgeons of London, onde aprimorei meus conhecimentos sobre lavado broncoalveolar.

Aos meus pais Timoteo e Aurora pelo exemplo de trabalho e especial carinho que sempre me dedicaram.

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese a Omar, companheiro de todos os momentos de minha vida.

RESUMO

A superfície das células endoteliais é recoberta por microdomínios constituídos de carga negativa. A presença de substâncias catiônicas, por exemplo polications, em contato com a derme, peritônio e pata de rato desencadeiam um processo inflamatório caracterizado pela infiltração de leucócitos e aumento da permeabilidade local.

Neste trabalho avaliou-se o efeito de polications (poli-L-arginina e poli-L-lisina) em duas superfícies de características fisiológica e morfológica distintas: a pleura e o alvéolo. Para tal, empregou-se o modelo da pleurisia (pleura) e o modelo da instilação intratraqueal de polications (alvéolo) em animais.

Polications foram agentes capazes de induzir pleurisia e edema de pulmão. A introdução intratraqueal desse agente, na mesma dose utilizada por via pleural apresentou alta mortalidade. A resposta inflamatória a esse composto depende do local de sua aplicação. A depleção de histamina e 5-HT nos animais reduziu e o volume de exsudato produzido nos animais submetidos à pleurisia, porém não reduziu a mortalidade nos animais que receberam polications pela via intratraqueal.

O antagonismo da carga dos polications, através da utilização de agentes aniônicos (sulfato de heparina e de dermatam) reduziu drasticamente o volume de exsudato pleural e aboliu completamente o efeito letal desse agente quando realizada a instilação intratraqueal.

Esses resultados sugerem que a superfície pleural e alveolar são dotadas de microdomínios negativos, que podem ser neutralizados durante o processo inflamatório. de acordo com essa teoria agentes aniônicos aferecem uma nova abordagem terapêutica no tratamento da inflamação.

Índice

Capítulo I Introdução Geral	1
Capítulo II Material e Métodos	4
Capítulo III Pleurisia	8
Capítulo IV Edema de Pulmão	51
Capítulo V Conclusões Gerais	87
Summary	90
Referências Bibliográficas	92

Capítulo I

Introdução Geral

I - Introdução

A natureza das cargas elétricas de membranas celulares e suas modificações por diferentes agentes tem sido relacionada a diferentes patologias. As membranas celulares de macrófagos (Skultelsky *et al.*, 1975), linfócitos (Marinovsky *et al.*, 1974), fibroblastos (Subjeck & Weiss., 1975) e células endoteliais de vasos são negativamente carregadas (Skultelsky *et al.*, 1975). Acredita-se que essa propriedade contribua para a repulsão mútua entre células e estruturas vasculares (Katchalsky *et al.*, 1959). Sawyer & Srinivasan (1972) sugerem que alterações na densidade de cargas da superfície endotelial, como resultado da lesão de endotélio, poderiam iniciar a formação de trombo na parede do vaso.

A carga da superfície endotelial pode ser determinada através da microscopia eletrônica de varredura com utilização de policátions marcados, como a ferritina cationizada (Danon *et al.*, 1972). Com a utilização desse método, demonstrou-se que a superfície endotelial apresenta sítios aniônicos que em contato com a ferritina cationizada se agregam, seguindo a internalização e despreendimento desse complexo, deixando a superfície destituída de sítios aniônicos (Skultelsky & Danon., 1976). Os microdomínios aniônicos das células endoteliais do pâncreas e mucosa intestinal são constituídos de glicosaminoglicanos sulfatados, principalmente o sulfato de heparina (Simionescu *et al.*, 1981).

As células endoteliais contraem-se frente a mediadores tipo histamina (Majno *et al.*, 1969). Essa atividade resulta na internalização e protusão da membrana. A internalização de vesículas tem a finalidade de regenerar a membrana (Skultelsky & Danon, 1976), e como consequência desse processo há substituição de novos sítios aniônicos.

A passagem transvascular de moléculas é controlada pelo tamanho e configuração molecular e pelas forças hemodinâmicas que ocorrem através da microcirculação e é influenciada pela interação de cargas na superfície do endotélio (Simionescu *et al.*, 1981). A membrana basal glomerular contém sítios aniônicos fixos que estão relacionados com o transporte de substâncias aniônicas através dessa barreira (Barnes *et al.*, 1984). Capilares glomerulares filtram moléculas aniônicas mais lentamente que moléculas catiônicas (Brenner *et al.*, 1978). Em contraste, na microcirculação pulmonar a passagem transvascular de ânions é facilitada quando comparado com substâncias neutras (Pietra *et al.*, 1982). Uma vez que esses dois órgãos apresentam microdomínios aniônicos em sua superfície endotelial, essa diferença de transporte provavelmente ocorre devido a diferença estrutural e de cargas na membrana basal e interstício (Parker *et al.*, 1985). A membrana basal do capilar pulmonar e alveolar é densa e amorfa, e contém sítios aniônicos, que diferem para essas duas estruturas. A membrana basal alveolar contém maior densidade de sítios aniônicos em sua superfície que a capilar. Esses sítios são constituídos principalmente por proteoglicanos contendo sulfato de heparina, enquanto que a membrana capilar contém esses e outros proteoglicanos sulfatados (Vaccaro & Brodi., 1981).

Policátions são liberados por plaquetas (Camussi *et al.*, 1986), leucócitos humanos (Zeya & Spitznagel, 1966) e de coelho (Olsson & Vangue, 1974), que podem interagir com a carga da superfície celular de diferentes sítios.

Policátions sintéticos tipo polilisina, poliarginina e sulfato de protamina apresentam várias ações "in vivo" e "in vitro". Causam aumento da permeabilidade e infiltração de leucócitos quando aplicados na derme ou no peritônio de ratos (Stein *et al.*, 1956), na pele de coelho (Needham *et al.*, 1988), e na pata de rato (Antunes *et al.*, 1990). Quando injetados por via intravenosa em ratos, induzem a coagulação sanguínea e sintomas anafilactóides (Rubini *et al.*, 1953), edema de retina (Lin, 1988), hipertensão e edema pulmonar (Fairman

et al., 1987). Substâncias catiônicas sintéticas têm sido empregadas no tratamento de doenças oncológicas em humanos. É descrito que pacientes que recebem a droga endovenosamente apresentam efeitos colaterais como febre, hipotensão, leucopenia, e reações tipo anafilactóide (Krown *et al.*, 1985).

Polications *in vitro* possuem atividade antibacteriana (Odenberg & Olsson, 1975), liberam histamina (Kazimierczak & Diamond, 1978) agregam plaquetas (Jenkins *et al.*, 1971; Guccione *et al.*, 1986), e agregam e induzem fusão de vesículas sintéticas (Gad *et al.*, 1982).

A polilisina libera prostaciclina e purinas citoplasmáticas de células endoteliais de aorta de porco em cultura (Needham *et al.*, 1988) e libera ácido araquidônico e prostaglandinas de fibroblastos em cultura (Shier *et al.*, 1984). O mecanismo proposto e a interação de cargas catiônicas com sítios aniônicos na superfície da célula alvo (Shier & Dubourdiou, 1986). Cultura de células glomerulares epiteliais aumentam a produção de prostanóides quando expostas a polilisina (Pugliese *et al.*, 1987). Poliaminoácidos básicos ricos em arginina, lisina ou ornitina estimulam a formação e/ou liberação do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF; Furchgott & Zawadzki, 1980; Thomas *et al.*, 1986) em segmentos de veia e artérias bovina perfundida (Ignarro *et al.*, 1989)

A utilização de substâncias aniônicas, como a albumina (Chang *et al.*, 1987), heparina e ácido poli-L-aspartico (De vries *et al.*, 1953) inibe as lesões decorrentes dos polications em diversos sistemas. A heparina se liga ao endotélio vascular (Hiebert *et al.*, 1981).

Os polications parecem iniciar o processo inflamatório pela agregação dos sítios aniônicos, deixando a superfície celular destituída da camada de cargas negativas (Skultelsky & Danon, 1976), favorecendo assim a passagem de mediadores e células para o local da inflamação.

Objetivos

Com base nessas informações os objetivos desta tese são:

- 1- Observar os efeitos dos polications, principalmente poli-L-arginina e poli-L-lisina quando introduzidos em duas superfícies de características morfológica e fisiológica distintas, tais como:

- Pleura;
- Alvéolo.

Os efeitos dos polications na superfície pleural serão avaliados através da utilização do método da pleurisia, e os efeitos na superfície alveolar através da produção de edema de pulmão pela instilação intratraqueal dos polications.

- 2- Avaliar os possíveis mediadores envolvidos no processo inflamatório induzido pelos polications.
- 3- Observar o efeito da neutralização de polications através da utilização de ânions, nesses modelos de inflamação.

A literatura referente às alterações decorrentes na pleura e alvéolo serão discutidas nos capítulos III e IV respectivamente.

Capítulo II

Material e Métodos

II - Material e Métodos

II-1 Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, pesando 250-400g.

Para a análise histológica dos pulmões foram utilizados além de ratos coelho macho da linhagem New-Zealand pesando 2.5kg; cobaia albina da linhagem inglesa, macho, pesando 300-400g; camundongo macho da linhagem Swiss, pesando 30-40g. Acesso à alimentação e água dos animais foi ad libitum.

II-2 Hemograma

Os ratos foram anestesiados com éter etílico, e amostras de sangue foram coletadas por incisão da cauda. O sangue (10ul) foi diluído (1/20) em solução de Turk e a contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Para a contagem do diferencial de leucócitos, as lâminas foram cobertas com o corante de May-Grunwald-Giensa e examinadas em microscopia ótica. O resultado foi expresso em porcentagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN).

II-3 Pleurisia

Os ratos foram anestesiados com éter etílico e a pleurisia foi induzida através de injeção, no sexto espaço intercostal esquerdo, de 0.1ml do agente flogístico, diluído em salina. Após intervalos de tempo estipulados (1, 4, e 6 horas) os animais foram anestesiados e exsanguinados através da incisão dos vasos cervicais. O torax foi aberto e a cavidade pleural foi lavada com tãmpao salina-fosfato heparinizado (2ml; heparina sodica 10U/ml). O exsudato produzido, foi aspirado e mensurado em ml, subtraindo-se o volume de tãmpao adicionado. Amostras (10ul) de exsudato foram diluídas em solução de Turk e a leitura realizada em câmara de Neubauer. O resultado foi expresso em células totais x 10⁶ (células/ml X volume total de exsudato). O diferencial de células foi analisado conforme descrito acima. O volume de exsudato restante foi congelado a -20 C.

II-4 Edema de Pulmão

O edema de pulmão foi induzido sob anestesia após incisão a nível da fúrcula esternal, divulsão dos músculos supratraqueais e injeção intratraqueal (IT) do agente flogístico diluído em salina. Imediatamente após a injeção IT 2 movimentos respiratórios sob pressão positiva foram realizados através de uma cânula de borracha posicionada na narina do animal permitindo que o conteúdo injetado se distribuisse para todos os lobos pulmonares e impedindo o refluxo para a cavidade nasal. Após intervalos de tempo determinado (1, 1 1/2, 3, 4, e 6 horas) os animais foram anestesiados com éter etílico e exsanguinados através de incisão dos vasos cervicais.

II-5 Sobrevida dos Animais

O índice de sobrevida dos animais foi expresso em porcentagem:

número de animais sobreviventes/ número de animais injetados IT X 100

II-6 Frequência Respiratória

A frequência respiratória foi estimada através da observação do animal por 5 minutos.

II-7 Índice Pulmonar Seco-úmido

Uma vez induzido o edema de pulmão o torax foi aberto e o pulmão retirado. Os tecidos adjacentes aos lobos pulmonares foram removidos e o pulmão pesado (peso úmido) e colocado para a secagem em estufa a 60°C por 24 horas, e novamente pesado (peso seco). O resultado foi expresso conforme a fórmula:

peso pulmonar seco/ peso pulmonar úmido X 100. (Bakhle, 1982).

II-8 Lavado Broncoalveolar (LBA)

Após indução do edema de pulmão a traqueia foi canulada e injetada com 5 ml de tampão salina-fosfato. O torax foi suavemente massageado e o conteúdo aspirado com uma seringa de plástico. O procedimento foi repetido novamente, com um volume total injetado de 10 ml. O volume recuperado foi mensurado em ml, e expresso em porcentagem do volume injetado. Alíquotas (10ul) do volume recuperado foram utilizadas para a contagem do número total de células (células/ml X volume recuperado total). Para a análise do diferencial de células, 1 ml do LBA foi centrifugado a 2000rpm por 15 minutos, o sobrenadante desprezado e realizado um esfregaco em lâmina com o concentrado do volume remanescente. Para a análise do diferencial de células seguiu-se o procedimento descrito acima. O restante do volume do LBA foi estocado a -20 C.

II-9 Histologia Pulmonar

Ratos- Os animais foram anestesiados com éter etílico. Após incisão a nível da fúrcula esternal, injetou-se 1mg/IT de poliarginina 24 KD, solução de 1mg/ml, e após decorrido o tempo de 3 horas, os animais foram reanestesiados com éter etílico, o torax foi aberto, e o pulmão foi removido e mantido em líquido de Bouin ate o processamento histológico. Após a fixação, cortes transversos nos lobos pulmonares foram realizados e processados para histologia em parafina. Cortes de 4 um desses blocos de parafina, foram corados com hematoxilina-eosina e analisados sob microscopia ótica.

Coelho- O animal foi mantido anestesiado com tiopental 50mg/kg/iv por 3 horas. Realizou-se uma incisão a nível da fúrcula esternal, divulsão dos músculos supratraqueais e injeção IT de 1 ml de poli-L-arginina 24 KD (4mg/kg, solução de 1 mg/ml), seguido de dois movimentos respiratórios com pressão positiva através de uma câmara de borracha posicionada na narina do animal. Após 3 horas da injeção intratraqueal o pulmão foi removido e processado conforme descrito anteriormente.

Cobaia- Após as cobaias serem anestesiadas com uretana (50mg/kg/ip) injetou-se 1 mg de poli-L-arginina 24KD IT (solução 1mg/ml). A cobaia foi reanestesiada com uretana após 3 horas, o pulmão removido, e processado para a análise histológica.

Camundongo- Os camundongos foram anestesiados em câmara de éter, e injetados IT (0.1ml) com poli-L-arginina 24KD (solução 1mg/ml). Após 3 horas os animais foram reanestesiados, e os pulmões removidos após abertura do tórax. O processamento para a análise histológica foi feito conforme descrito acima.

II-10 Determinação os Níveis de TXB₂ E 6oxoPGF_{1α}

A determinação dos níveis de TXB₂ (tromboxano) e prostaciclina (6oxoPGF_{1-α}) foi realizado por radioimunoensaio. O anticorpo de coelho foi diluído 1/400 em tampão tris-HCL (50mM de tampão tris pH 7.4, contendo 0.1% de gelatina) e alíquotas (0.1ml) foram adicionadas ao padrão ou amostras (0.1ml em tampão tris-gelatina). Eicosanoide[³H] em tampão gelatina (0.1ml contendo aproximadamente 10.000 dpm) foi adicionado ao tubo de vidro, dando um volume de 0.4 ml. A incubação permaneceu por 4-24h a 0-4 C. Parar a remoção do material não ligado, adicionou-se a mistura de carvão e dextran (0.2ml de tampão contendo 4 mg de carvão e 0.8 mg de dextran) em cada tubo, os quais foram agitados por 10 segundos. Os tubos permaneceram em gelo por 10 minutos, e foram centrifugados (2500rpm) por 10 minutos em centrifuga refrigerada spin VI (Incubras). O sobrenadante contendo o complexo (antígeno-anticorpo) foi decantado e misturado com fluido de cintilação (5ml) e a contagem foi realizada em contador beta (Beckman).

A eficiência da contagem foi determinada utilizando-se padrões externos. O procedimento descrito acima foi realizado para TXB₂ e 6-oxo-PGF_{1α} (Salmon, 1978).

II-11 Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Lowry (1951), em amostras do LBA (100ul).

II-12 Depleção de PMN

Ratos foram depletados de PMN através da utilização de metotrexato 2.5mg/kg/ip por 3 dias seguidos. Os animais foram utilizados para o experimento 3 dias após a última injeção de metotrexato. A queda nos leucócitos circulantes foi acompanhada através da análise do sangue periférico antes do tratamento e no terceiro dia após a última administração da droga (Willoughby & Giroud 1969).

II-13 Depleção de Histamina e 5-HT

Para a depleção de histamina e 5-HT, ratos foram tratados com o composto 48/80 intraperitoneal (ip) de 12/12 horas, por 8 doses consecutivas. As primeiras 6 doses foram de 0.6mg/kg e as últimas de 1.2 mg/kg. O experimento foi realizado 5-6 horas após a última injeção de 48/80 (Di Rosa *et al.*, 1971).

II-14 Antagonismo de Histamina e 5-HT

Os receptores de histamina (H1) e 5-HT foram bloqueados através da utilização de mepiramina e metisergida em ratos, respectivamente, ambos na dosagem de 2 mg/kg/ip 30 minutos antes do experimento (Di Rosa *et al.*, 1971).

II-15 Antagonismo da Carga Catiônica dos Policátions

O antagonismo das cargas cationicas da poli-L-arginina foi realizado através da utilização de compostos aniônicos (sulfato de heparina e de dermatam).

II-16 Bloqueio da Cicloxigenase

O inibidor da cicloxigenase indometacina foi administrado em ratos na dosagem de 2 mg/kg/ip 30 minutos antes do experimento.

II-17 Preparação das Drogas

Todas as drogas foram diluídas em solução salina 0.9%, exceto a indometacina (NaHCO₃ 5%).

Poli-L-arginina (24, 115 e 139,2 KD), Poli-L-lisina (2 e 85 KD), lambda-carragenina, sulfato de dermatam, composto 48/80, mepiramina, histamina e indometacina foram obtidos da Sigma Chemical CO (St Louis, MO), e metotrexato do Laboratório Bristol (SP, Brasil). Metisergida e heparina sodica foram cedidos pelo laboratório Sandoz (SP, Brasil) e Roche (SP, Brasil) respectivamente. O material radioativo [3H] 6oxo-PGF_{1-α} e [3h]TXB₂ foi obtido da Amersham International, Bucks, UK.

II-18 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, para um determinado n. Para a comparação das medias utilizou-se o test t Student, não pareado, tomando-se como significativo os valores de $p < 0.05$.

Capítulo III
Pleurisia

III - Introdução

A pleura de mamíferos é uma membrana serosa que reveste o parênquima pulmonar, mediastino, diafragma, e a caixa torácica em sua superfície interna. De acordo com sua localização é denominada pleura parietal ou visceral, apresentando diferenças morfológicas e fisiológicas segundo a localização. A superfície pleural é recoberta por células achatadas, chamadas células mesoteliais. O aspecto a olho nu é de uma superfície lisa, porém observações da microscopia eletrônica de varredura, revelam microvilosidades predominantemente na pleura visceral, com a função de absorver o fluido formado na cavidade pleural. De acordo com a equação de Starling, o vetor de absorção através da pleura visceral é similar ao vetor de formação através da pleura parietal, e o maior número de microvilosidades na pleura visceral explicaria porque a cavidade permanece quase livre de fluido (Agostoni, 1972; Wang, 1974).

Enquanto na pleura parietal a camada de células mesoteliais esta diretamente em contato com uma camada de tecido conjuntivo, rico em colágeno e fibras elásticas, a pleura visceral repousa sobre uma delicada camada de tecido conjuntivo, que por sua vez liga-se a uma camada mais profunda, que contém muito colágeno e fibras elásticas. Entre essas duas camadas de tecido conjuntivo está o leito vascular da pleura visceral, contendo uma rica rede de capilares, que apresentam um diâmetro tres vezes maior que os capilares dos demais tecidos. Este aumento de diâmetro proporciona uma baixa pressão nesse leito vascular, favorecendo a absorção de fluidos (Light, 1983).

A superfície pleural visceral e parietal apresentam vasos linfáticos distribuídos por toda sua extensão, que drenam para sítios distintos. A porção caudal da pleura mediastinal em ratos e humanos apresentam células mesoteliais modificadas, que recobrem agregados de macrófagos e linfócitos. Esta estrutura chamada foco de Kampmeir, apresenta a função de impedir a drenagem de possíveis agentes lesivos situados no espaço pleural para o tecido mediastinal e pulmonar (Cooray, 1949).

Utilizando albumina marcada com ¹³¹I, Spector (1956), demonstrou a alteração de permeabilidade dos capilares no modelo de pleurisia induzido pela terebentina. A carragenina, foi utilizada por Winter (1962), como agente flogístico no modelo do edema de pata. Esse modelo foi considerado a base para a descoberta da indometacina (Winter *et al.*, 1962). Desde então a carragenina tem sido utilizada na indução de processo inflamatório, através da aplicação intraplantar no modelo do edema de pata (Winter *et al.*, 1962); intrapleural na pleurisia (Di Rosa *et al.*, 1971); implantação de esponja em subcutâneo (Higgs *et al.*, 1976); e implantação de bolsa de ar no tecido celular subcutâneo (Edwards *et al.*, 1981). O modelo da pleurisia apresenta sobre os outros modelos a vantagem de se poder estimar o edema mais preciso, de se poder determinar a quantidade e qualidade de células que migram para o espaço pleural, além de oferecer a oportunidade de dosar mediadores do processo inflamatório no exsudato formado.

Aparentemente estes mediadores são vários e participam da resposta inflamatória induzida pela carragenina, liberados em 3 fases. As aminas histamina e 5-HT (1ª fase). Cininas (2ª fase), e as prostaglandinas (3ª fase). Essa sequência de mediadores ocorre no processo inflamatório induzido por outros agentes como a terebentina no modelo de edema de pata e pleurisia (Willis, 1969; Di Rosa *et al.*, 1971).

Com o objetivo de se indagar os possíveis efeitos de policátions sobre a fisiologia pleural utilizou-se o modelo da pleurisia em ratos. A utilização de policátions na pleura não foi descrita em literatura corrente.

III-1 Métodos

Foram utilizados ratos machos (Wistar, 250-400g), para os seguintes experimentos: Contagem total e diferencial do sangue periférico e indução da pleurisia. A indução da pleurisia foi avaliada em animais controle e tratados (depleção de PMN; depleção de histamina e 5-HT; antagonismo dos receptores de histamina e 5-HT; bloqueio da cicloxigenase; e antagonismo de carga dos policátions).

III-2 Resultados

III-2-1 Efeito dos Policátions nos Leucócitos Circulantes

A administração intravenosa (veia peniana) de 1 mg de poli-L-arginina 24KD (0.4ml), em ratos levou a uma leucocitose precoce em sangue periférico (Fig Ia). O número de leucócitos retornou a níveis basais na 4ª hora após a injeção de policátions. O aumento na porcentagem de PMN tornou-se evidente a partir da 4ª hora, normalizando na 24ª hora (FigIb). Utilizou-se como grupo controle animais que receberam salina iv (0.4ml). Figura Ib.

A introdução intrapleural de 1 mg de poli-L-arginina 24KD (0.1ml) causou uma leucocitose em sangue periférico na 6ª hora (pré: 22.8 ± 2.4 ; pós: 34.7 ± 4.3 ; $n = 5$; $p < 0.05$). Os animais que receberam salina intrapleural (0.1ml), também apresentaram aumento no número de leucócitos na 6ª hora (pré: 22.2 ± 2.0 ; pós: 33.7 ± 3.8 ; $n = 5$; $p < 0.05$). Na primeira hora do experimento não houve diferença na contagem de leucócitos periféricos no grupo que recebeu poli-L-arginina (pré: 24.4 ± 1.2 ; pós 27.9 ± 2.4 ; $n = 5$) ou nos que receberam salina (pré: 25.9 ± 3.0 ; pós 21.9 ± 2.5 ; $n = 5$).

III-2-2 Indução da Pleurisia

O volume e a celularidade produzidos pela pleurisia induzida pela poli-L-arginina 24KD 1mg/pleura (0.1ml), em ratos, foi comparada com um grupo controle que recebeu salina intrapleural (0.1ml). Houve diferença significativa quanto ao volume de exsudato produzido na 1ª e 6ª hora. A celularidade diferiu do grupo controle na 6ª hora. Figura IIa,b.

A figIII.a,b,c mostra a comparação do exsudato pleural e a celularidade na pleurisia induzida por poli-L-arginina 24KD 1mg/pleura (0.1ml) e a carragenina 100ug/pleura (0.1ml). A lavagem da cavidade pleural forneceu os valores basais. Quanto a migração celular para a cavidade pleural e o aumento percentual de PMN, foram tempo dependente para a poliarginina 24KD ($p < 0.05$). A injeção intrapleural de poliarginina induziu pleurisia na 1ª hora que se manteve até a 6ª hora. Na carragenina o edema foi comparativamente menor.

Essa migração celular poderia ser decorrente da distensão do espaço pleural pelo volume de plasma extravazado. Grupos de animais foram submetidos a injeção de 0.1 e 0.2

FIG I-A

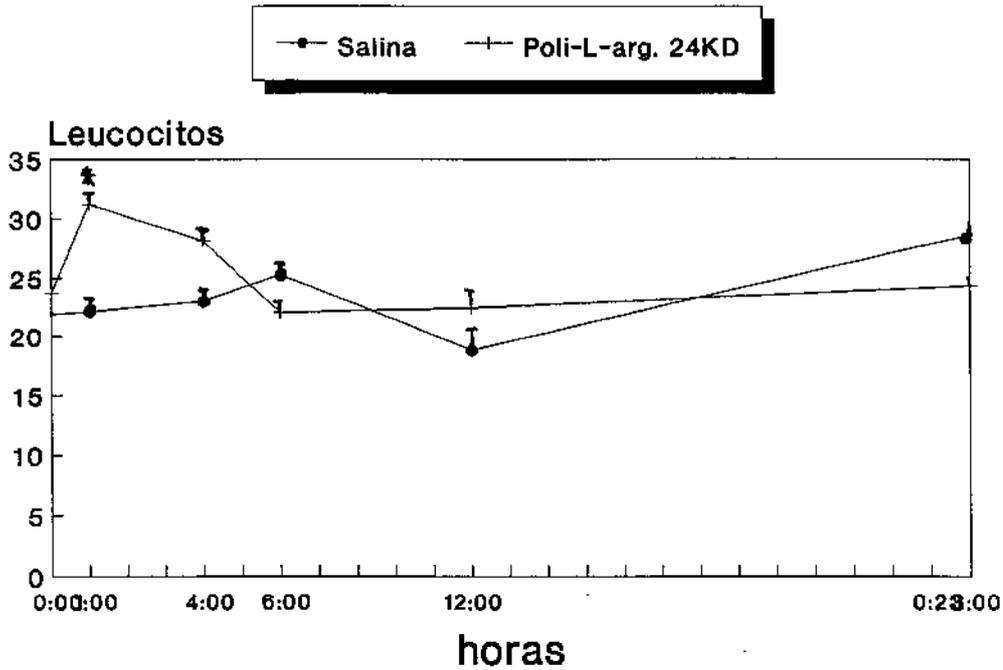


FIG I- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAVENOSA DE POLI-L-ARGININA (24KD) NA LEUCOCITEMIA.

Contagem de leucócitos no sangue periférico após injeção intravenosa de poli-L-arginina 24KD (1mg/0.4ml, n = 8) e salina (0.4ml, n = 7). Resultado expresso em leucócitos $\times \text{mm}^3 \times 10^3$. (* p < 0.05).

Figura I-B

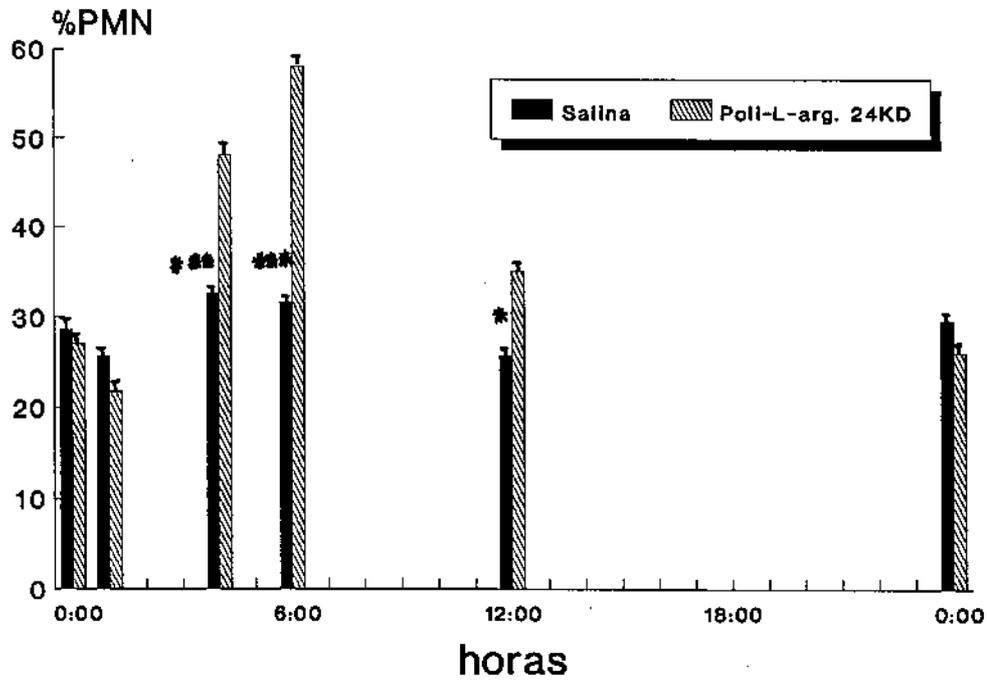


FIG I- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAVENOSA DE POLI-L-ARGININA (24KD) NA LEUCOCITEMIA.

Porcentagem de leucócitos PMN no sangue periférico após injeção intravenosa de poli-L-arginina 24KD (1mg/0.4ml, n = 8) e salina (0.4ml, n = 7). (*p < 0.05, ***p < 0.001).

FIG II-A

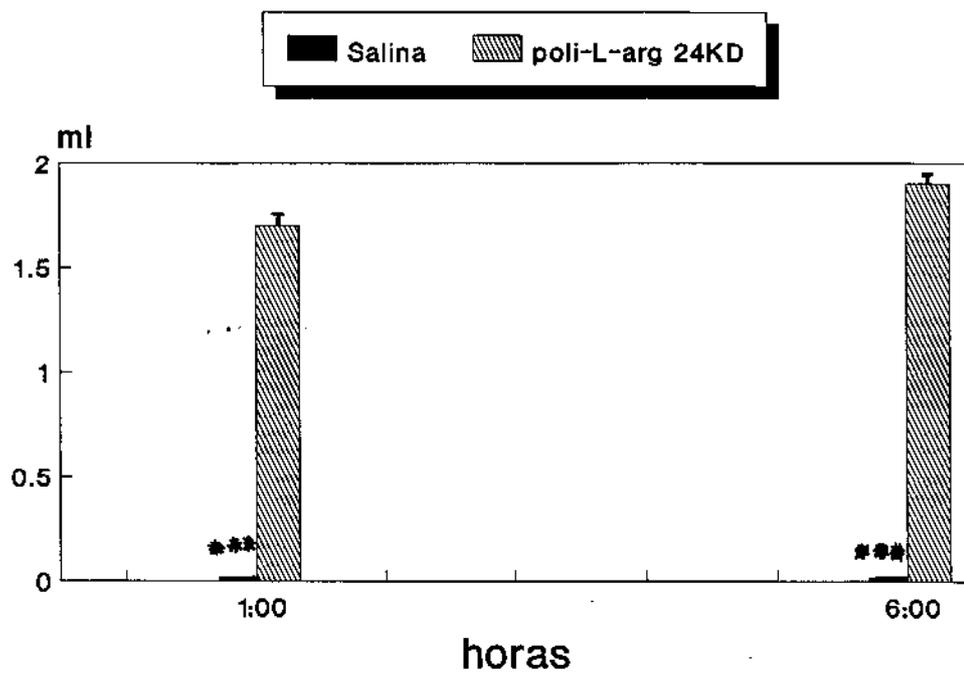


FIG II- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE POLI-L-ARGININA 24KD.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n = 5) e salina (0.1ml, n = 5) foram injetados no espaço pleural. O volume de exsudato produzido foi mensurado ml. (***) $p < 0.001$).

FIG II-B

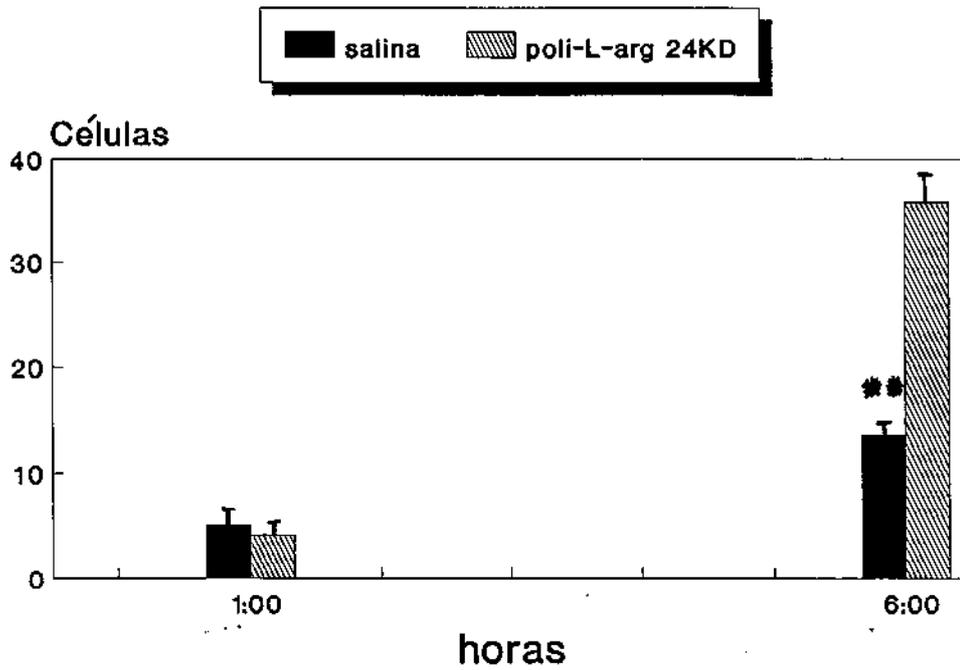


FIG II- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE POLI-L-ARGININA 24KD.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n = 5) e salina (0.1ml, n = 5) foram injetadas no espaço pleural. A celularidade no exsudato pleural foi expressa em células totais x 10⁶. (p < 0.01).

FIG III-A

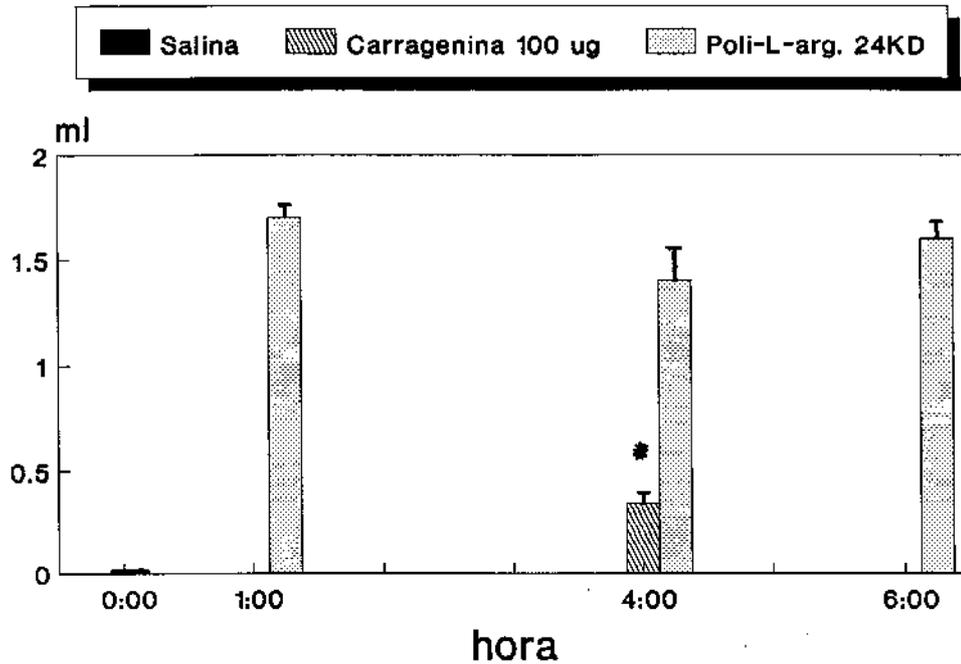


FIG III- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE POLI-L-ARGININA 24KD E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n=5), carragenina (100ug/0.1ml, n=5) foram injetados no espaço pleural. O volume de exsudato produzido foi mensurado em ml e analisado 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural de poli-L-arginina, e 4 horas após para a injeção de carragenina. A lavagem da cavidade pleural (adicionado salina 0.1ml, n=5) forneceu o valor basal (zero hora). (* $p < 0.05$)

FIG III-B

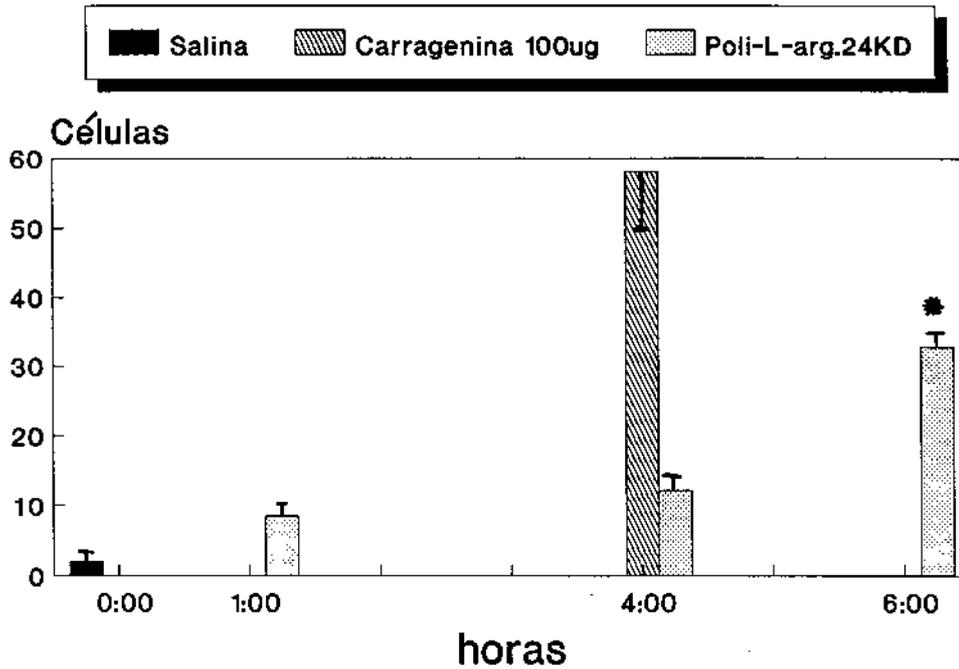


FIG III- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE POLI-L-ARGININA 24KD E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n=5), salina (0.1ml, n=5) e lambda-carragenina (100ug/0.1ml, n=5) foram injetados no espaço pleural. A celularidade produzida no exsudato pleural foi expressa em células totais $\times 10^6$, e foi analisada após 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural de poli-L-arginina e 4 horas após a injeção de carragenina. A lavagem da cavidade pleural (adicionado salina 0.1ml, n=5) forneceu o valor basal (zero hora). (* $p < 0.05$)

FIG III-C

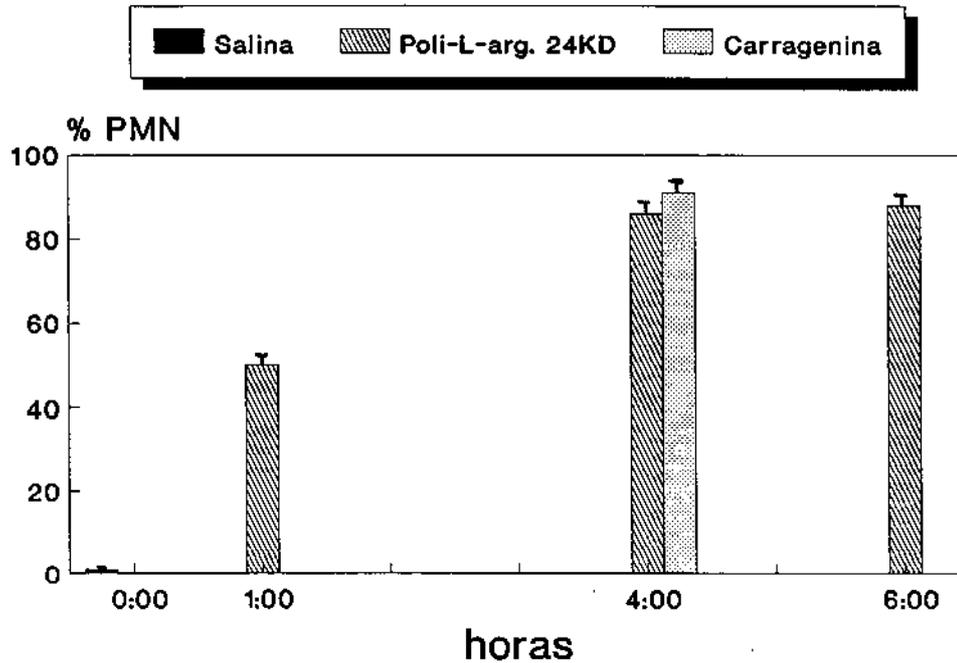


FIG III- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE POLI-L-ARGININA 24KD E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n=5), salina (0.1ml, n=5) e lambda-carragenina (100ug/0.1ml, n=5) foram injetados no espaço pleural. A porcentagem de PMN na celularidade produzida no exsudato pleural, e foi analisada após 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural de poli-L-arginina e 4 horas após a injeção de carragenina. A lavagem da cavidade pleural (adicionado salina 0.1ml, n=5) forneceu o valor basal (zero hora). (* $p < 0.05$)

ml de salina na cavidade pleural, e avaliados 1 e 6 horas após. A figIVa mostra uma reabsorção de 40% do volume injetado no grupo de animais que receberam 2 ml de salina intrapleural na 1ª hora, e 60% na 6ª hora. Na primeira hora não houve diferença significativa na migração celular quando comparada ao nível basal de células na cavidade pleural ou com o grupo que recebeu 0.1 ml de salina. Na 6ª hora após a indução da pleurisia houve diferença significativa na migração celular ($p < 0.001$). FigIVa,b.

A FigVa,b demonstra o perfil da pleurisia induzida por poli-L-arginina 24 e 115KD (1mg/0.1ml/pleura). Não houve diferença quanto ao volume de exsudato. A celularidade foi maior para a poli-L-arginina 24KD na 1ª hora ($p < 0.05$).

A dose de poliarginina de 1 mg/pleura poderia desencadear uma resposta inflamatória máxima, impedindo a determinação de diferenças dependentes do tamanho molecular dos polications. Utilizou-se poli-L-arginina 24 e 139.2KD na dose de 300ug/pleura, e comparou-se o efeito quanto ao volume produzido e celularidade 6 horas após o estímulo pleural. Nessa dose não houve diferença significativa quanto ao volume de exsudato e a migração celular para a cavidade pleural (FigVIa,b)

A poli-L-arginina 24KD, foi utilizada nas doses de 100 e 1000 ug/pleura (0.1ml) e comparada a pleurisia induzida por carragenina 100mg/pleura e salina (0.1ml) (Fig VII). O volume de exsudato e a migração celular produzidos foram avaliados 6 horas após a introdução de polications intrapleural. Houve diferença significativa no volume de exsudato e na celularidade.

A poli-L-arginina 24KD foi utilizada em 3 diferentes doses 100, 300 e 1000ug/pleura (0.1ml). O volume de exsudato e a migração celular foram avaliados 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural. A celularidade diferiu na 1ª e 4ª hora do experimento ($p < 0.05$) e o volume de exsudato em todos os tempos estudados ($p < 0.05$). (Fig VIII).

III-2-3 Depleção de PMN

Os animais tratados com metotrexato mostraram uma redução de 41% no número de leucócitos circulantes (pré 13810 ± 2400 ; pós 8162 ± 1490), e uma redução de 68% na porcentagem de PMN circulantes (pré $20.2 \pm 2.6\%$; pós $6.5 \pm 1.4\%$).

A pleurisia foi induzida com poli-L-arginina 24KD 1mg/pleura, tanto em animais controle como nos tratados com metotrexato. O exsudato e a celularidade foram analisados 4 horas após a injeção intrapleural de poliarginina. Houve uma redução significativa no volume de exsudato produzido (2.1 ± 0.08 ml; 1.32 ± 0.42 ml; $p < 0.01$), e uma redução no número de leucócitos totais $\times 10^6$ que migraram para a cavidade pleural (23.3 ± 1.4 ; 7.1 ± 1.4 ; $p < 0.001$) (Fig IXa,b). Em um grupo a pleurisia foi induzida com carragenina em animais controle e tratados com metotrexato, com o mesmo protocolo para a depleção de PMN.

III-2-4 Antagonismo dos Receptores para Histamina e 5-HT

A pleurisia induzida pelo composto 48/80, 10ug/pleura (0.1ml), apresentou redução significativa no volume de exsudato produzido nos animais que receberam o antagonista de receptor de histamina. O número de células que migrou para a cavidade pleural foi reduzido com o tratamento para os dois receptores (FigXa,b).

FIG IV-A

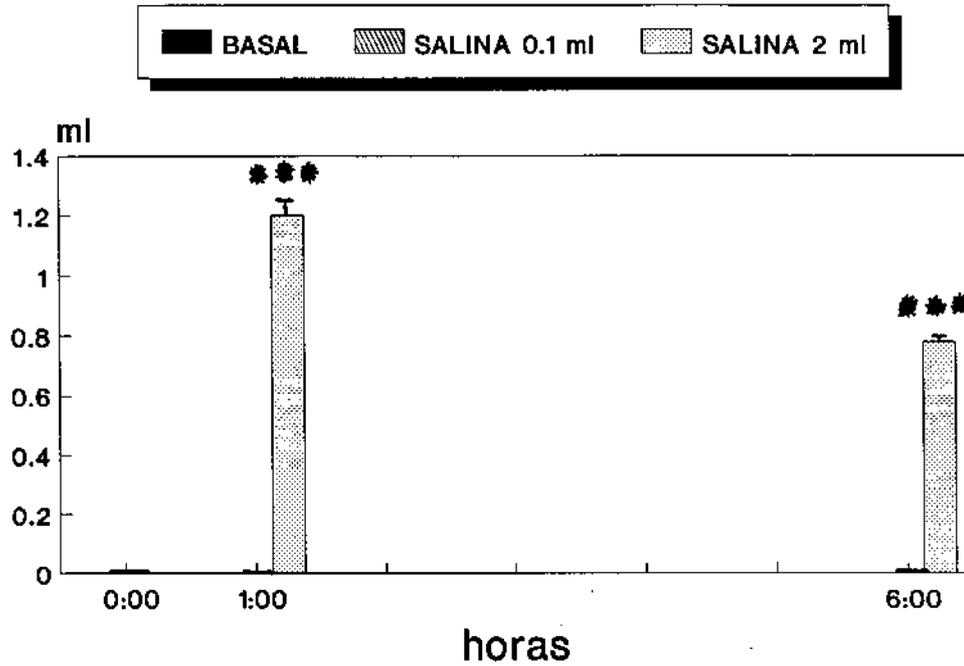


FIG IV- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE SALINA.

O volume de exsudato produzido aps a injeção intrapleural de salina em volumes distintos (0.1ml,n=5; e 2ml,n=5) foi mensurado em ml, e avaliado 1 e 6 horas após a injeção intrapleural. A lavagem da cavidade pleural (adicionado salina 0.1ml, n = 5) forneceu o valor basal (zero hora). (***) $p < 0.001$

FIG IV-B

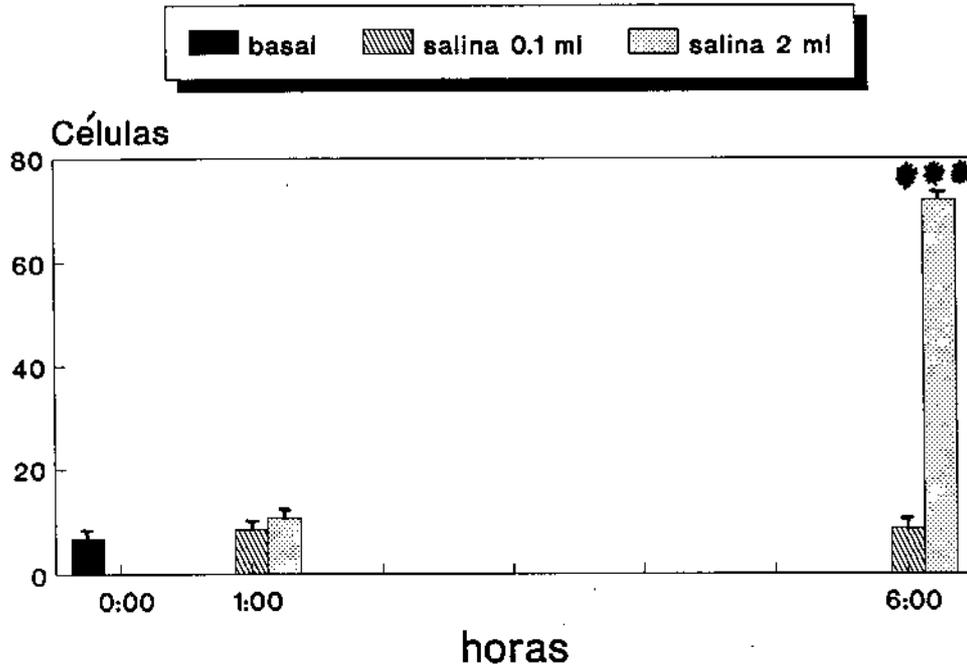


FIG IV- EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPLEURAL DE SALINA.

A celularidade no exsudato produzido após a injeção intrapleural de salina em volumes distintos (0.1ml,n = 5; e 2ml,n = 5) foi expressa em células totais $\times 10^6$, e avaliada 1 e 6 horas após a injeção intrapleural. A lavagem da cavidade pleural (adicionado salina 0.1ml, n = 5) forneceu o valor basal (zero hora). (***p < 0.001)

FIG V-A

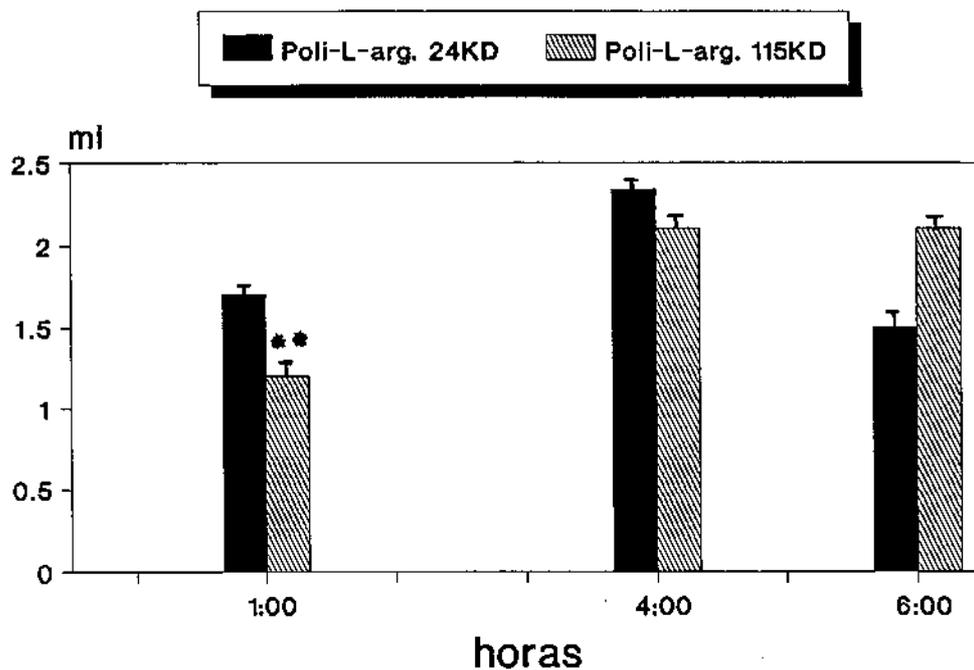


FIG V- EFEITO DO PESO MOLECULAR NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA.

A poli-L-arginina 24 e 115KD, (1mg/0.1ml,n = 5 para cada grupo) foram injetadas na cavidade pleural e o volume de exsudato produzido foi avaliado 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural. O exsudato foi mensurado em ml.(** p < 0.01)

FIG V-B

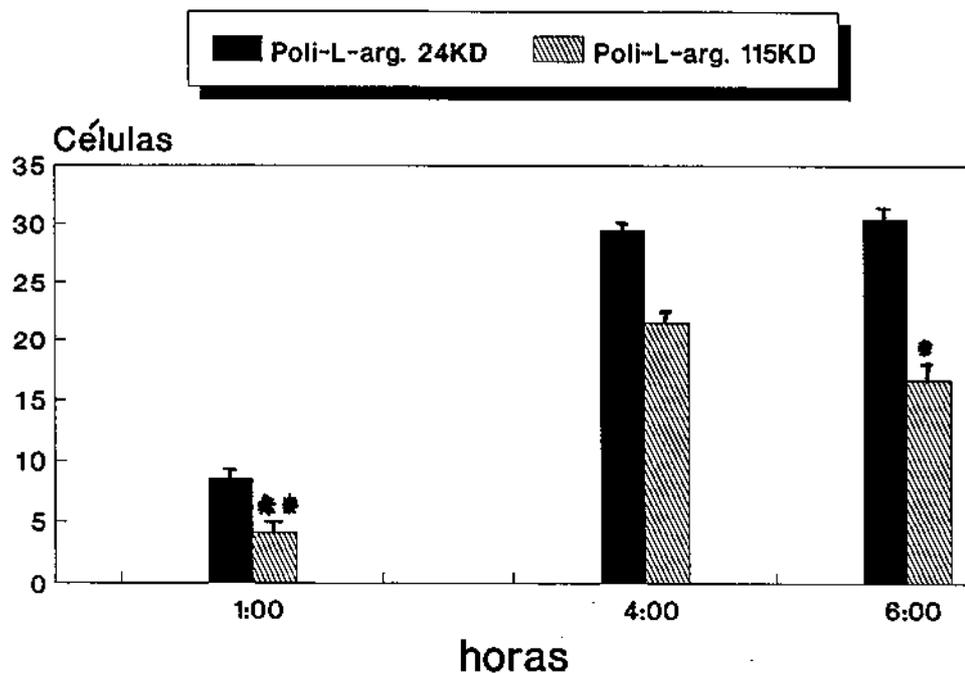


FIG V- EFEITO DO PESO MOLECULAR NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA.

A poli-L-arginina 24 e 115KD, (1mg/0.1ml, n = 5 para cada grupo) foram injetadas na cavidade pleural e a celularidade no exsudato produzido foi avaliada 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural. A celularidade foi expressa em células totais x 10⁶ (* p < 0.05, ** p < 0.01).

FIG VI-A

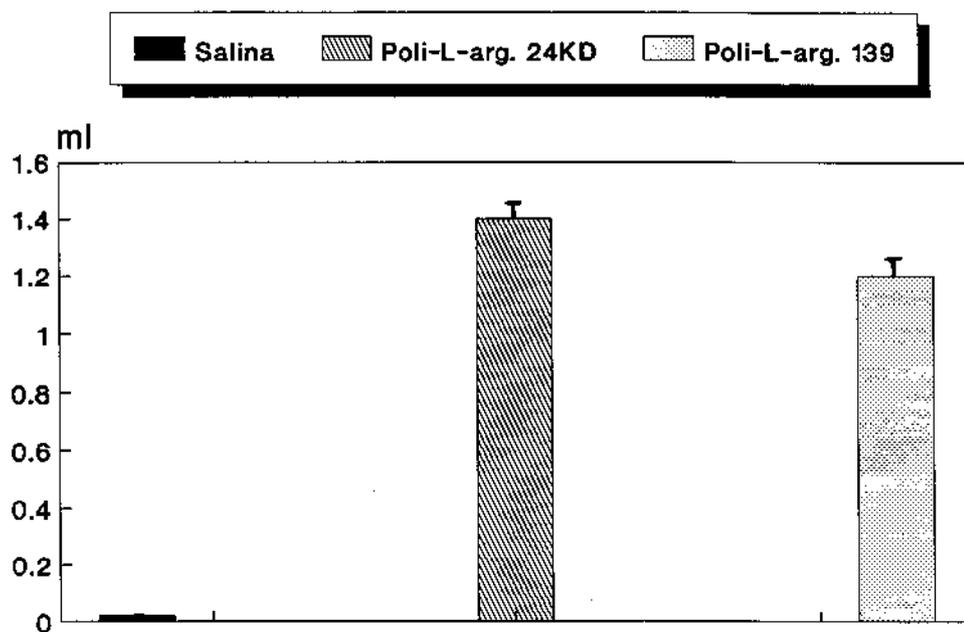


FIG VI- EFEITO DO PESO MOLECULAR NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA.

A poli-L-arginina 24 e 139KD (1mg/0.1ml, n = 5 para cada grupo) e salina (0.1ml, n = 5) foram injetadas na cavidade pleural e o volume de exsudato avaliado 6 horas após a injeção intrapleural. O volume de exsudato produzido foi mensurado em ml.

FIG VI-B

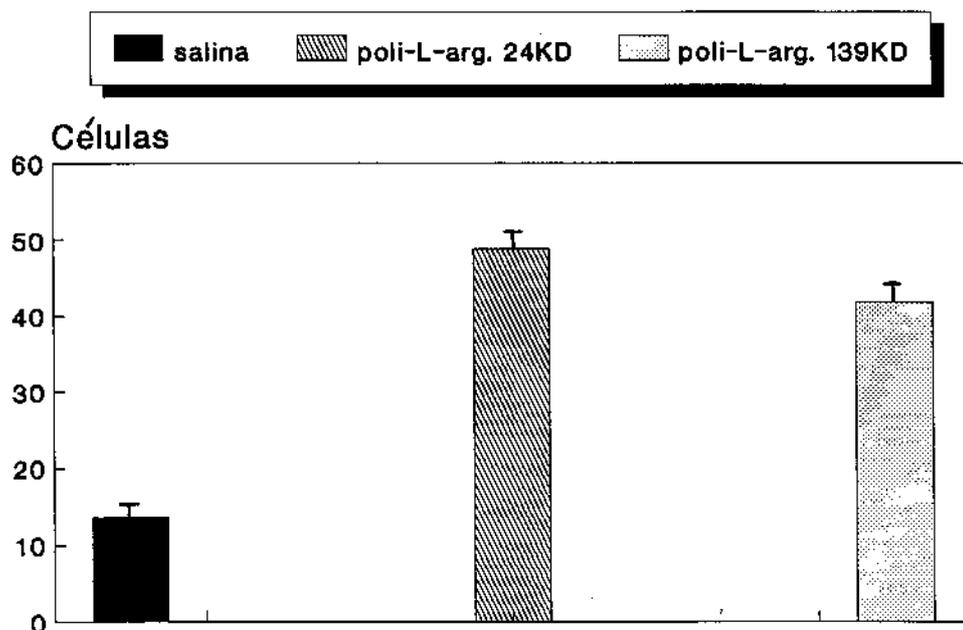


FIG VI- EFEITO DO PESO MOLECULAR NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA.

A poli-L-arginina 24 e 139KD (1mg/0.1ml, n = 5 para cada grupo) e salina (0.1ml, n = 5) foram injetadas na cavidade pleural e a celularidade do exsudato pleural avaliada 6 horas após a injeção intrapleural. A celularidade produzida foi expressa em células totais x 10⁶.

FIG VII-A

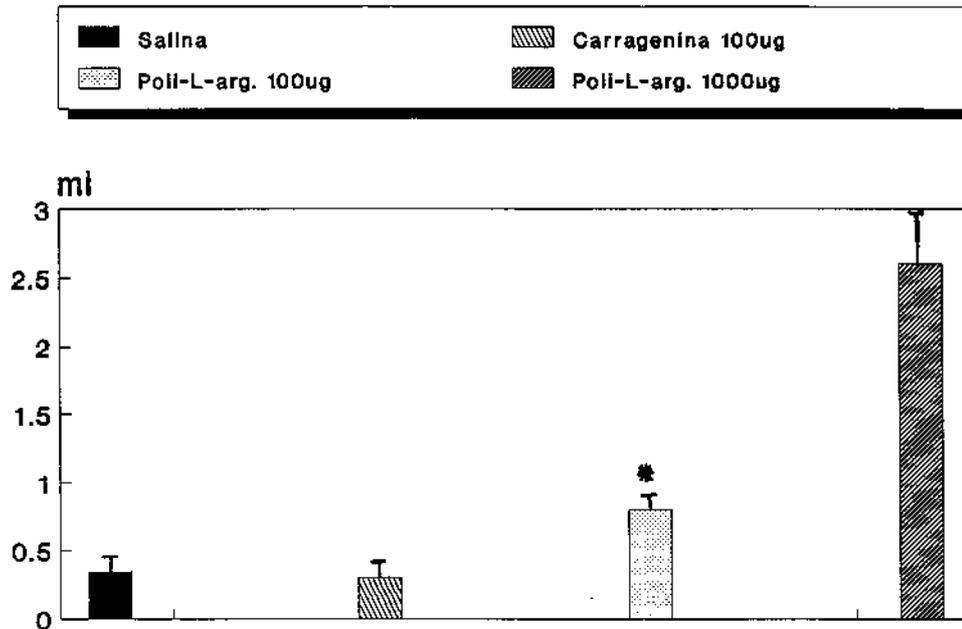


FIG VII- CURVA DOSE-RESPOSTA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD. COMPARAÇÃO COM CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (100 e 1000ug em 0.1ml, n=5 para cada grupo) e carragenina (100ug/0.1ml, n=5) foram injetados no espaço pleural e o volume de exsudato pleural produzido foi avaliados 6 horas após a injeção intrapleural. O volume foi mensurado em ml.

FIG VII-B

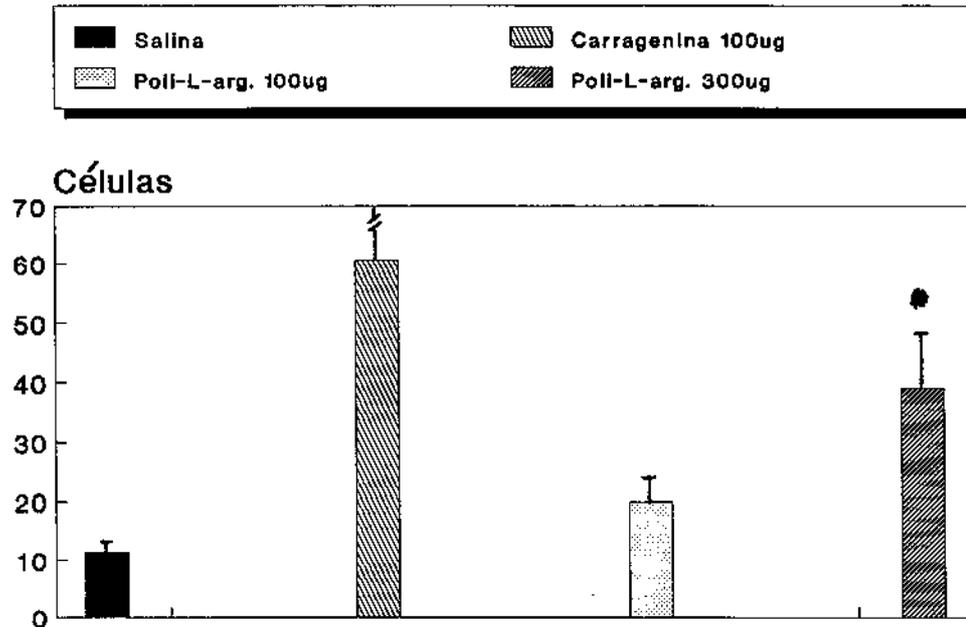


FIG VII- CURVA DOSE-RESPOSTA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD. COMPARAÇÃO COM CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (100 e 1000ug em 0.1ml, n=5 para cada grupo) e carragenina (100ug/0.1ml, n=5) foram injetados no espaço pleural e a celularidade do exsudato pleural foi avaliada 6 horas após a injeção intrapleural. A celularidade foi expressa em células totais $\times 10^6$.

FIG VIII-A

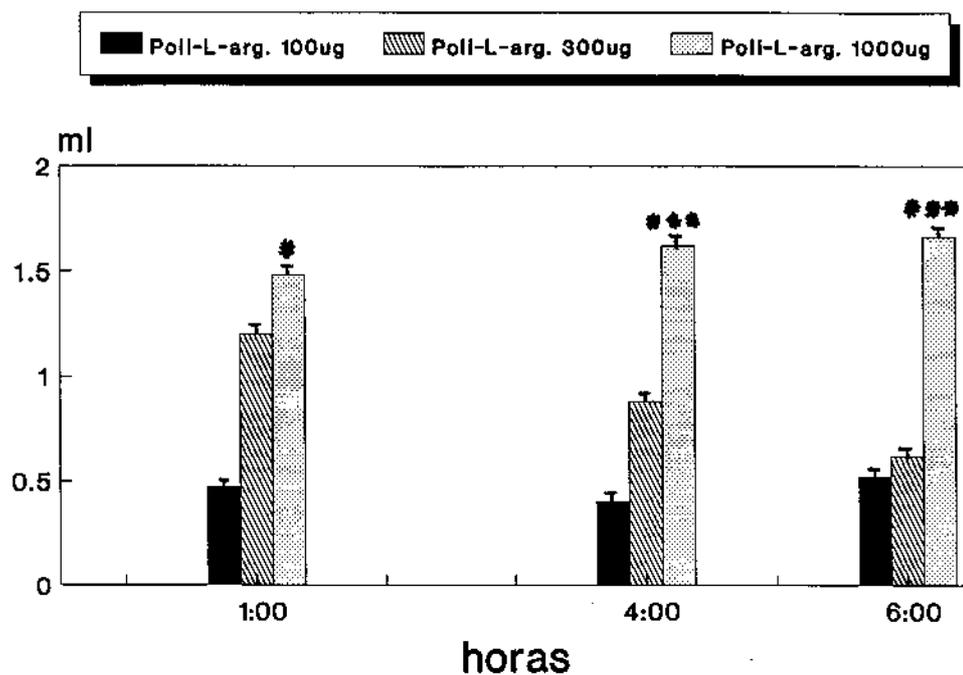


FIG VIII- CURVA DOSE-RESPOSTA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD EM FUNÇÃO DO TEMPO.

A poli-L-arginina 24KD (100, 300 e 1000ug em 0.1ml, n = 5 para cada grupo); e salina (0.1ml, n = 5) foram injetadas no espaço pleural e o volume de exsudato pleural produzido avaliado 1, 4 e 6 horas após. O volume foi mensurado em ml.

FIG VIII-B

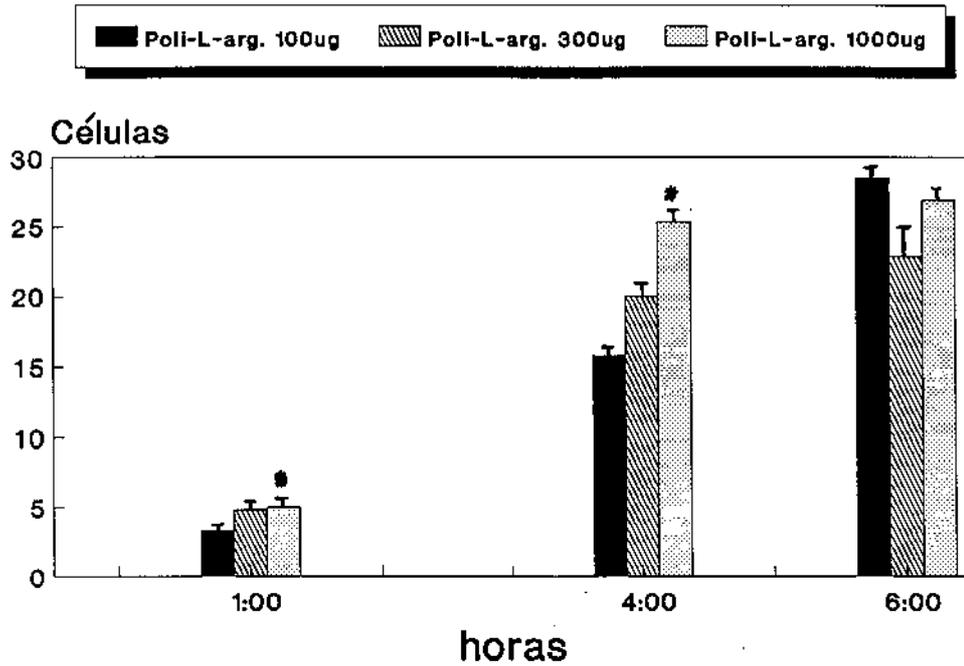


FIG VIII- CURVA DOSE-RESPOSTA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD EM FUNÇÃO DO TEMPO.

A poli-L-arginina 24KD (100, 300 e 1000ug em 0.1ml, n = 5 para cada grupo); e salina (0.1ml, n = 5) foram injetadas no espaço pleural e a celularidade do exsudato pleural avaliada 1, 4 e 6 horas apos. A celularidade foi expressa em células totais x 10⁶. (8 p < 0.05, *** p < 0.001)

FIG IX-A

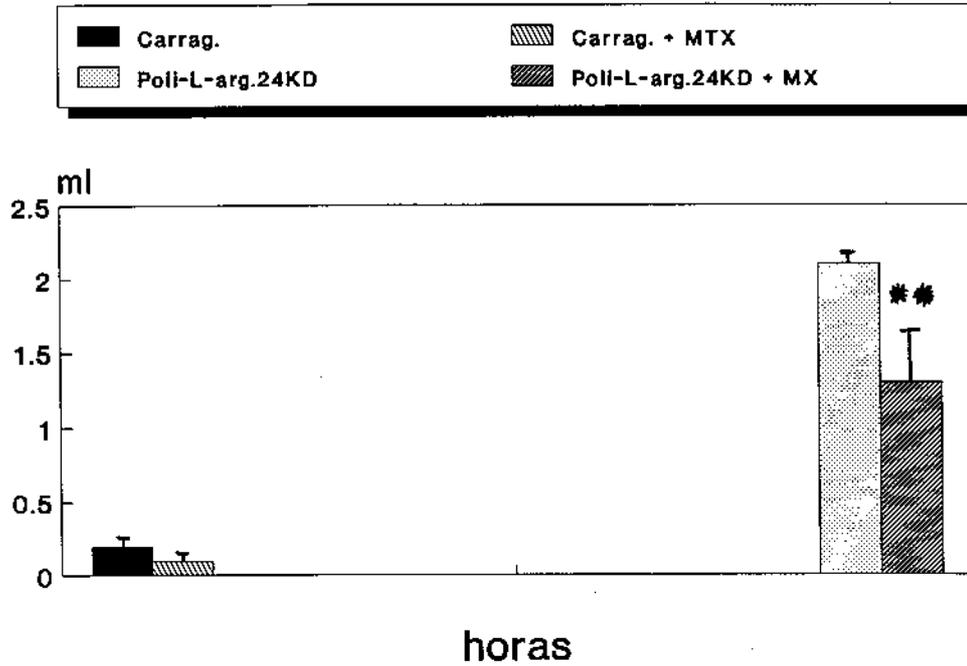


FIG IX- EFEITO DO METOTREXATO NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLIARGININA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n = 5) e carragenina (100ug/0.1ml, n = 4) foram injetados no espaço pleural de animais normais (N) e tratados previamente com metotrexato (MTX). O volume de exsudato produzido foi mensurado em ml e analisado 4 horas após a injeção intrapleural. (**p < 0.01)

FIG IX-B

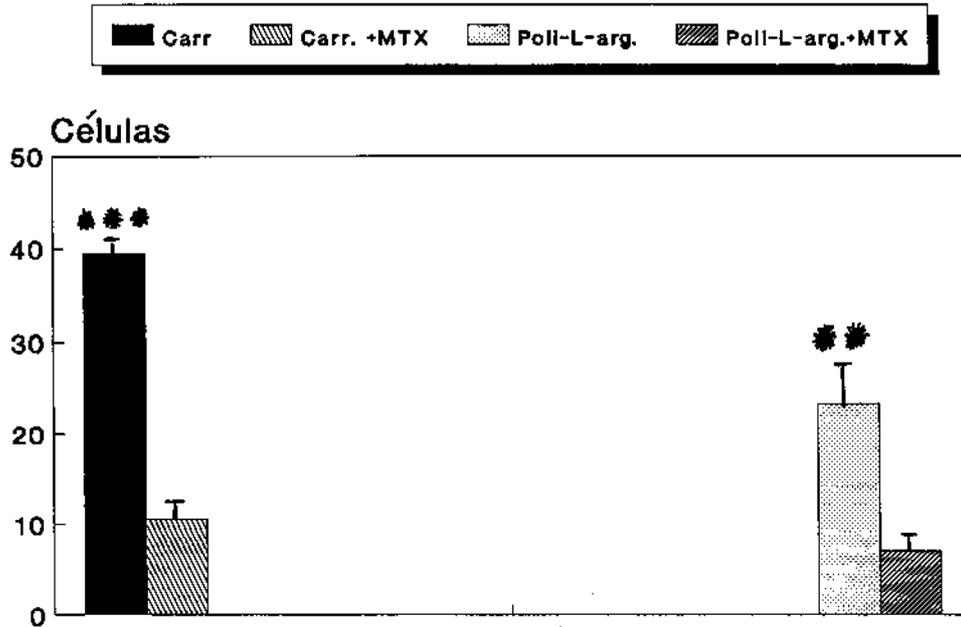


FIG IX- EFEITO DO METOTREXATO NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLIARGININA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n = 5) e carragenina (100ug/0.1ml, n = 4) foram injetados no espaço pleural de animais normais (N) e tratados previamente com metotrexato (MTX). A celularidade do exsudato produzido foi expressa em células totais x 10⁶ e analisada 4 horas após a injeção intrapleural. (** p < 0.01)

FIG X-A

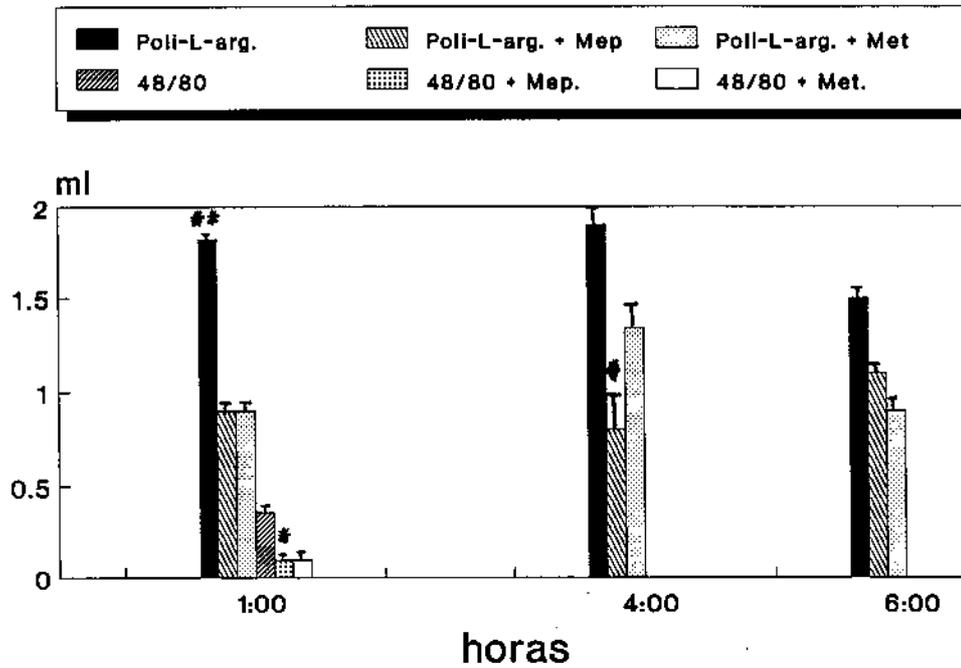


FIG X- EFEITO DA MEPIRAMINA E METISERGIDA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml) e o composto 48/80 (10ug/0.1ml) foram injetados no espaço pleural de animais normais(N) e tratados (T) com mepiramina e metisergida. O volume de exsudato produzido foi avaliado 1, 4 e 6 horas para os animais que receberam poli-L-arginina e 1 hora após para os que receberam o composto 48/80, e expresso em ml.(n = 4 ou 5 para cada grupo) (* p < 0.05, ** p < 0.01)

FIG X-B

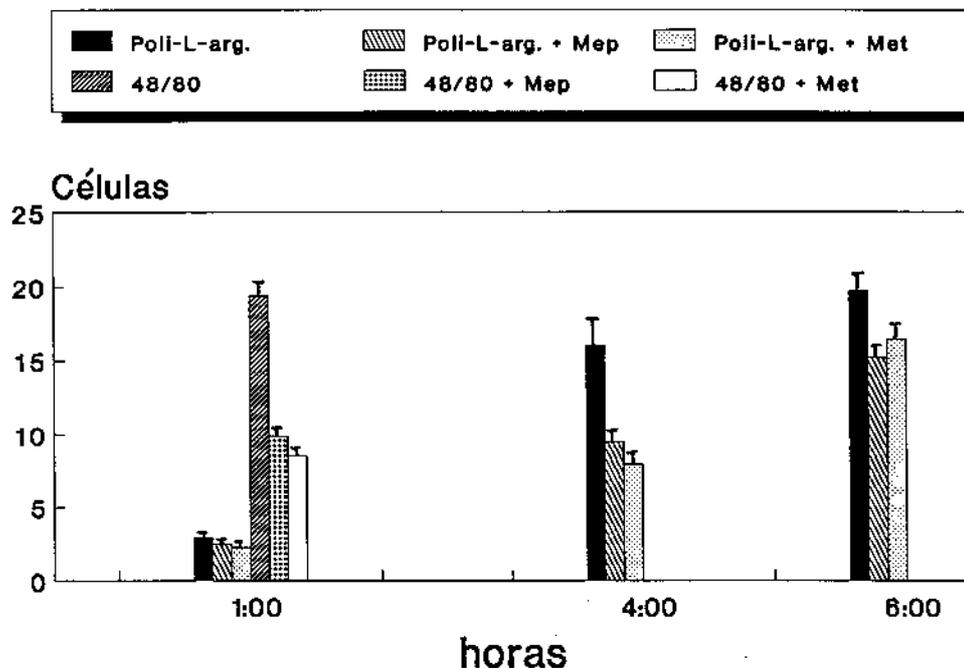


FIG X- EFEITO DA MEPIRAMINA E METISERGIDA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml) e o composto 48/80 (10ug/o.1ml) foram injetados no espaço pleural de animais normais(N) e tratados (T) com mepiramina e metisergida. A celularidade do exsudato pleural foi avaliada 1, 4 e 6 após a injeção intrapleural de poli-L-arginina e 1 hora após a injeção do composto 48/80. (n = 4 ou 5 para cada grupo) (* p < 0.05).

O antagonismo dos receptores de histamina e serotonina reduziu em 50% o volume de exsudato pleural na pleurisia induzida por poli-L-arginina 24KD (1mg/pleura), na 1ª e 4ª hora (figXa,b), porém não houve redução na migração de leucócitos para a cavidade pleural.

III-2-5 Depleção de Histamina e 5-HT

O composto 48/80 foi utilizado para a depleção de histamina e 5-HT. A pleurisia foi induzida com poli-L-arginina 24KD, (1mg/pleura), e o exsudato e a celularidade analisados 1 e 6 horas após. Houve uma redução de 84% do volume de exsudato produzido na 1ª hora, e uma redução de 43,6% no número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural nessa hora (FigXIa,b), na sexta hora o volume foi reduzido em 75% e o número de células em 47,5%.

Como controle do experimento, animais foram submetidos a pleurisia com o composto 48/80 (10ug/pleura) em um grupo tratado e não tratado previamente. Houve redução do volume na 1ª hora, e redução celular na 6ª hora (Controle 0.2 ± 0.07 , $n = 4$. Tratados 12.5 ± 3 , $n = 4$. $p < 0.05$) (Fig XIa,b).

III-2-6 Antagonismo de Cargas

A heparina 50U foi injetada na cavidade pleural juntamente com a poli-L-arginina 24KD (1mg/pleura) e o exsudato e a celularidade analisados 1,4 e 6 horas após a injeção intrapleural da mistura. A Fig XIIb, mostra a redução dramática de 96% do volume de exsudato pleural na 1ª, 4ª e 6ª hora. A utilização da heparina 1000U iv, diminuiu o volume de exsudato em 40% apenas na 4ª hora, na pleurisia induzida por poli-L-arginina 24KD. Quanto a celularidade, figXIIb, houve redução apenas com a utilização de heparina iv na 4ª hora, quando a mistura heparina-poliarginina foi administrada houve um aumento da celularidade produzida, porém a maioria dos exsudatos apresentava aspecto sanguinolento.

Um outro agente o sulfato de dermatam, também foi utilizado para a neutralização de carga dos polícatíons. Uma mistura contendo poli-L-arginina 115KD 1mg + sulfato de dermatam 1.5mg, volume total de 0.1ml, foi injetada e a análise do volume de exsudato e a celularidade realizados 4 horas após. A fig XIIIa,b mostra os resultados obtidos.

III-2-7 Bloqueio da Cicloxigenase

A indometacina foi utilizada na dose de 2mg/kg/ip 30 minutos antes da injeção intrapleural do agente flogístico. A análise do volume de exsudato e a celularidade foram realizados 1 e 6 horas após. Utilizou-se como controle do bloqueio da cicloxigenase pela indometacina o modelo da pleurisia induzido pela carragenina (100ug/0.1ml/pleura) (FigXIVa,b). Houve redução significativa na celularidade na 6ª hora.

Não houve alteração significativa do volume ou celularidade na pleurisia induzida por poli-L-arginina 24KD e (1mg/pleura) (FigXIVa,b).

FIG XI-A

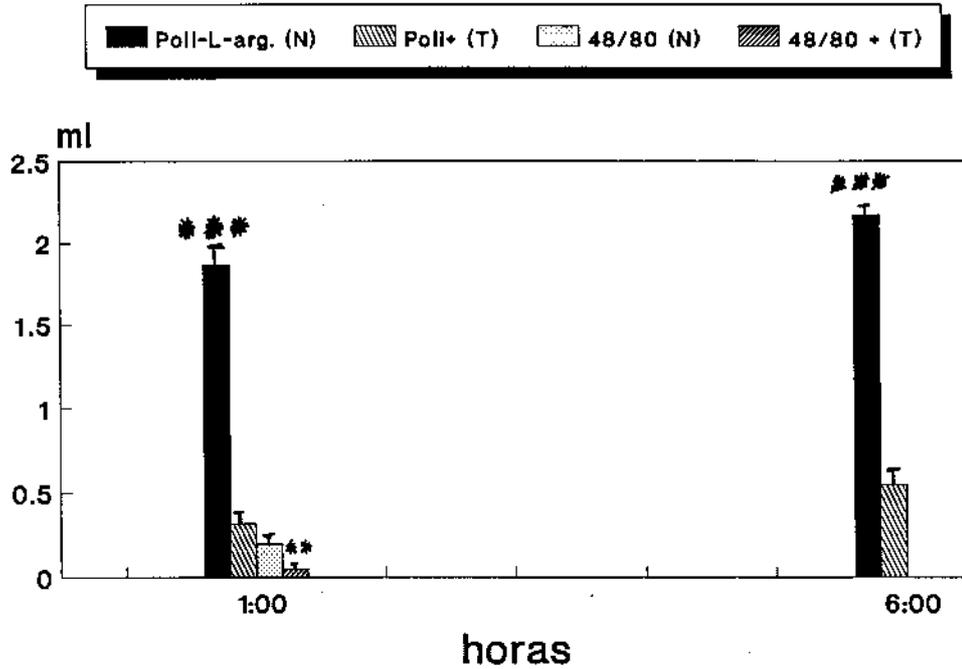


FIG XI- EFEITO DA DEPLEÇÃO DE HISTAMINA E 5-HT NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA.

A poli-L-arginina 24 KD (1mg/0.1ml, n = 5) e o composto 48/80- foram injetados na cavidade pleural de animais normais (N) e tratados previamente com o composto 48/80 (T). O volume de exsudato pleural produzido foi avaliado 1 e 6 horas após a injeção intrapleural. O volume de exsudato foi mensurado em ml. (***) $p < 0.001$ (n = 5 para a poli-L-arginina, e n = 4 para o composto 48/80).

FIG XI-B

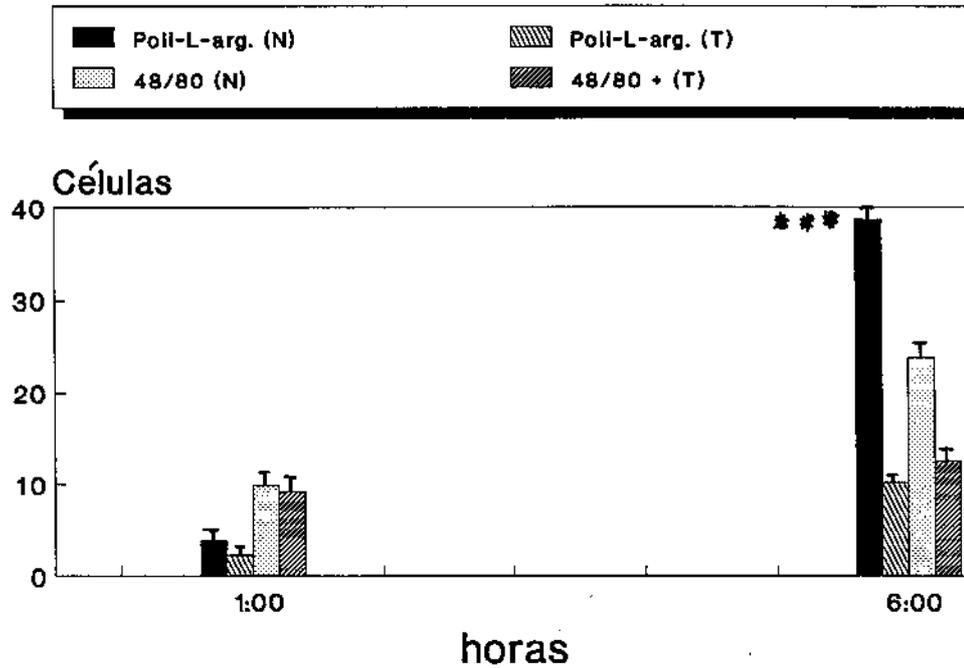


FIG XI- EFEITO DA DEPLEÇÃO DE HISTAMINA E 5-HT NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA.

A poli-L-arginina 24 KD (1mg/0.1ml, n = 5) e o composto 48/80 foram injetados na cavidade pleural de animais normais (N) e tratados previamente com o composto 48/80 (T). A celularidade do exsudato pleural foi avaliada 1 e 6 horas aps a injeção intrapleural, e expressa como células totais x 10⁰. (***) p < 0.001) (n = 5 para a poli-L-arginina, e n = 4 para o composto 48/80).

FIG XII-A

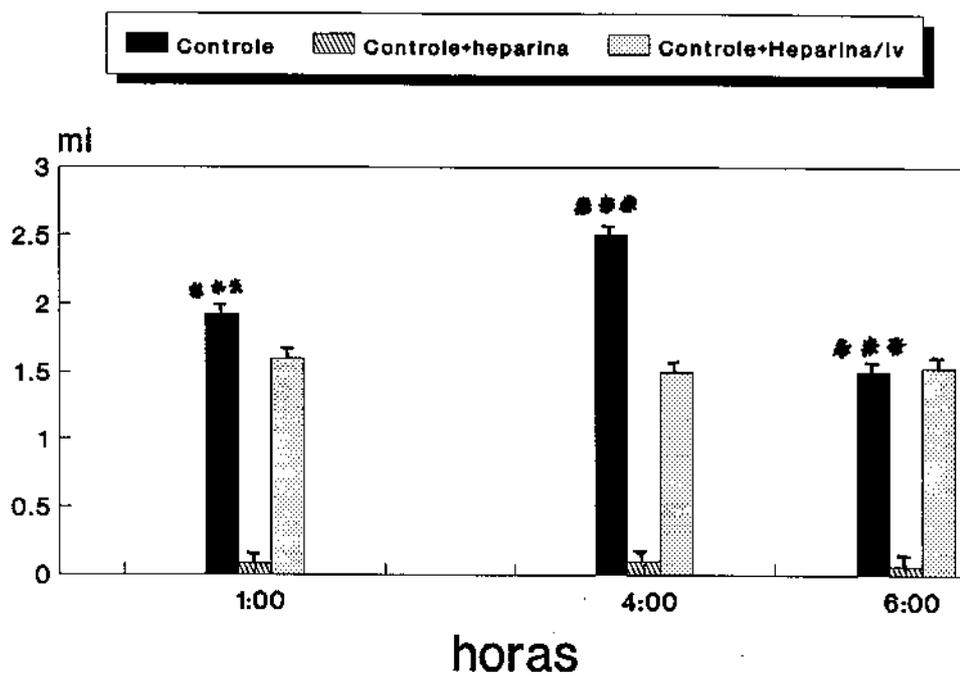


FIG XII- EFEITO DA HEPARINA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n=5) foi injetada na cavidade pleural de animais normais e animais tratados com sulfato de heparina (1000U/iv). Sulfato de heparina (50U,n=5) juntamente com poli-L-arginina 24KD foram injetados na cavidade pleural de animais normais. O volume de exsudato foi analisado 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural. O volume foi mensurado em ml. (***) $p < 0.001$.

FIG XII-B

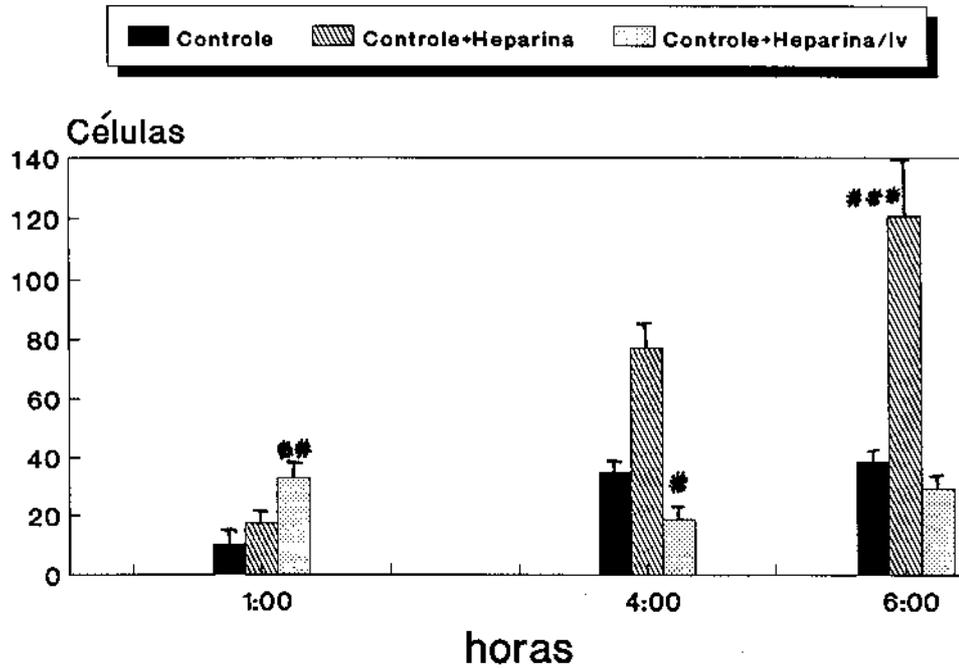


FIG XII- EFEITO DA HEPARINA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n=5) foi injetada na cavidade pleural de animais normais e animais tratados com sulfato de heparina (1000U/iv). Sulfato de heparina (50U, n=5) juntamente com poli-L-arginina 24KD foram injetados na cavidade pleural de animais normais. A celularidade do exsudato foi analisada 1, 4 e 6 horas após a injeção intrapleural, e expressa como células totais $\times 10^6$. (***) $p < 0.001$

FIG XIII

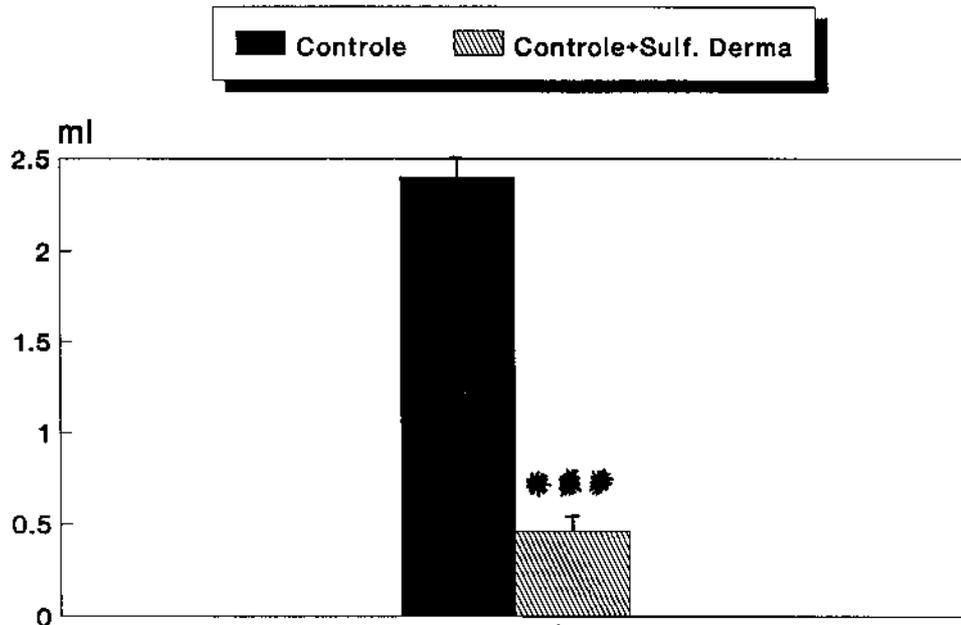


FIG XIII- EFEITO DO SULFATO DE DERMATAM NO VOLUME DE EXSUDATO NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 115KD.

A poli-L-arginina 115KD (1mg/0.1ml/pleura) , e poli-L-arginina 115KD(1mg) + sulfato de dermatam (1.5mg) foram injetados na cavidade pleural (volume 0.1ml). O volume de exsudato produzido foi avaliado 4 horas após, e mensurado em ml. (n=5 para cada grupo).(***) p<0.001)

FIG XIV-A

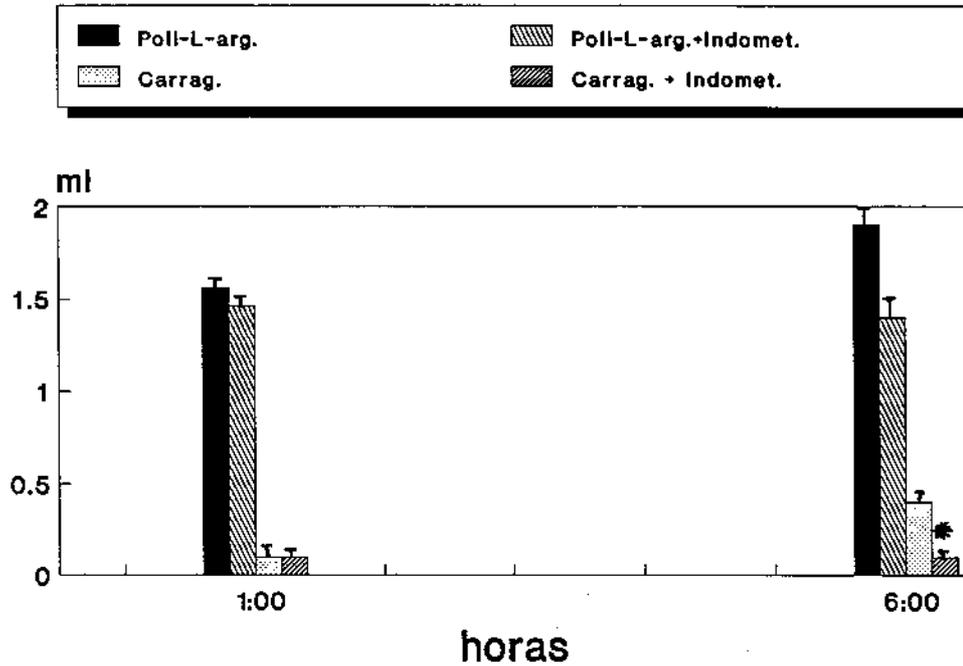


FIG XIV- EFEITO DA INDOMETACINA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n = 5) e carragenina (100ug/0.1ml, n = 5) foram injetados na cavidade pleural de animais normais e tratados com indometacina (2mg/kg/ip 30 min. antes da injeção intrapleural). O exsudato pleural produzido foi avaliado 1 e 6 horas após, e mensurado em ml. (* p < 0.05).

FIG XIV-B

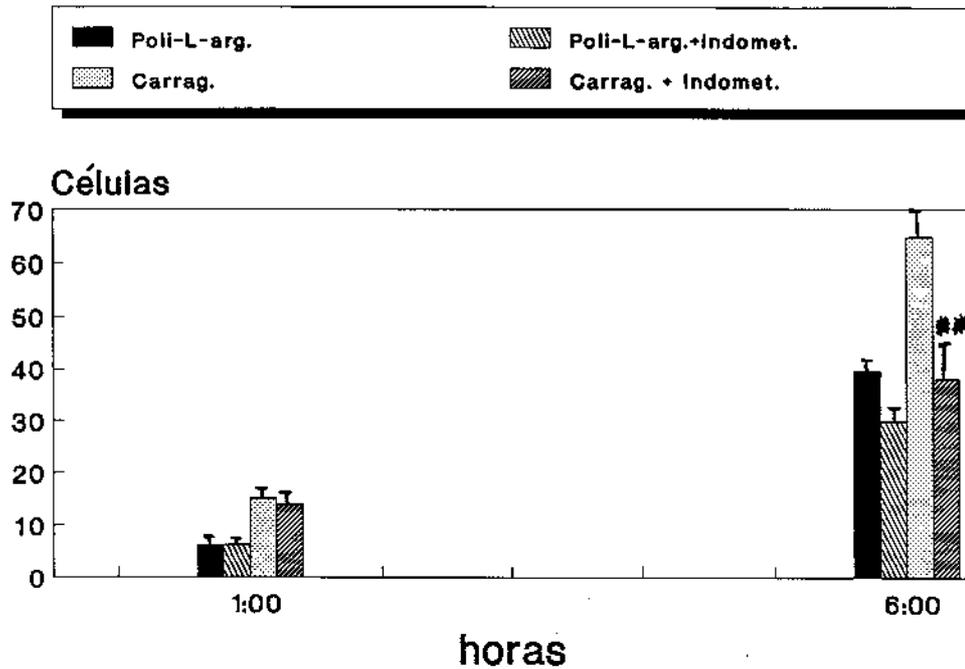


FIG XIV- EFEITO DA INDOMETACINA NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24KD (1mg/0.1ml, n = 5) e carragenina (100ug/0.1ml, n = 5) foram injetados na cavidade pleural de animais normais e tratados com indometacina (2mg/kg/ip 30 min. antes da injeção intrapleural). A celularidade do exsudato pleural foi avaliada 1 e 6 horas após, e expressa como células totais x 10⁶. (** p < 0.01).

FIG XV-A

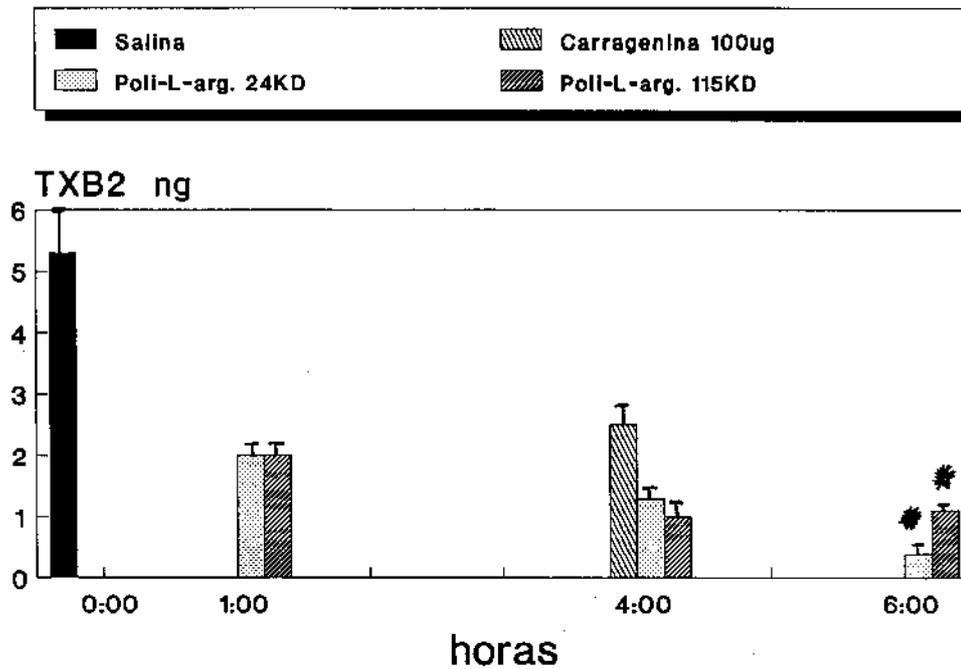


FIG XV- NÍVEIS DE TXB₂ NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA (24 E 115KD) E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24 e 115KD (1mg/0.1ml, N=5), salina (0.1ml, N=5) e carragenina (100ug/0.1ml, n=5) foram injetados na cavidade pleural e os níveis de TXB₂ avaliados nesse fluido 1, 4 e 6 horas após. O exsudato recuperado após a lavagem da cavidade pleural (adicionado 0.1ml de salina) forneceu os valores basais (zero hora, n=5). Os níveis de TXB₂ foram expressos em TXB₂ total em ng.

FIG XV-B

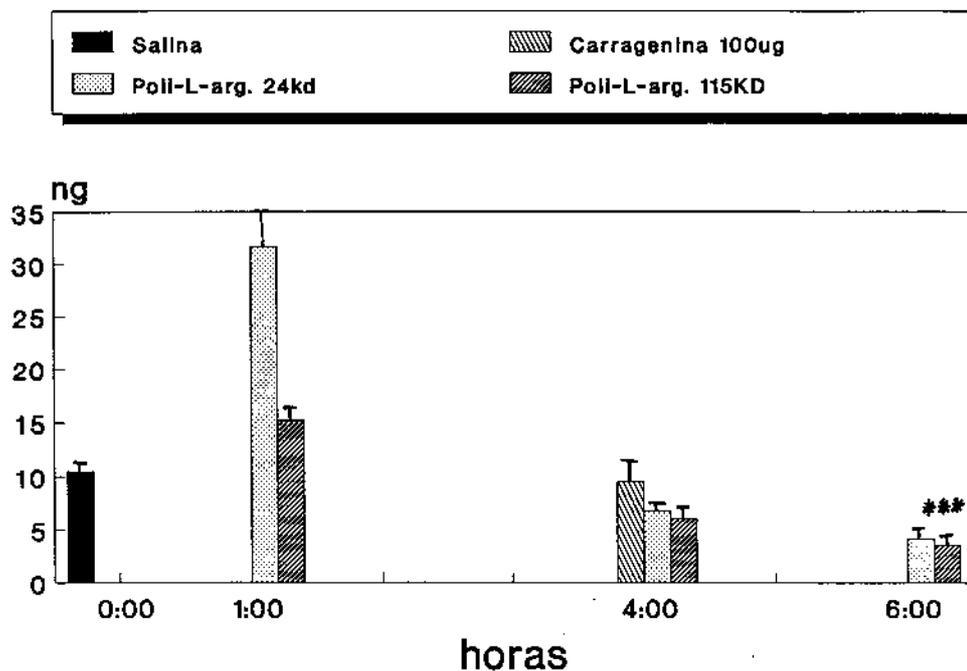


FIG XV- NÍVEIS DE 6-oxo-PGF₁α NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA (24 E 115KD) E CARRAGENINA.

A poli-L-arginina 24 e 115KD (1mg/0.1ml) e carragenina (100ug/0.1ml) foram injetados no espaço pleural, e os níveis de 6-oxo-PGF₁α foram analisados 1, 4 e 6 horas após. O exsudato recuperado após a lavagem da cavidade pleural (adicionado 0.1ml de salina) forneceu os valores basais desse mediador. Os valores foram expressos como 6-oxo-PGF₁α total em ng.

FIG XVI-A

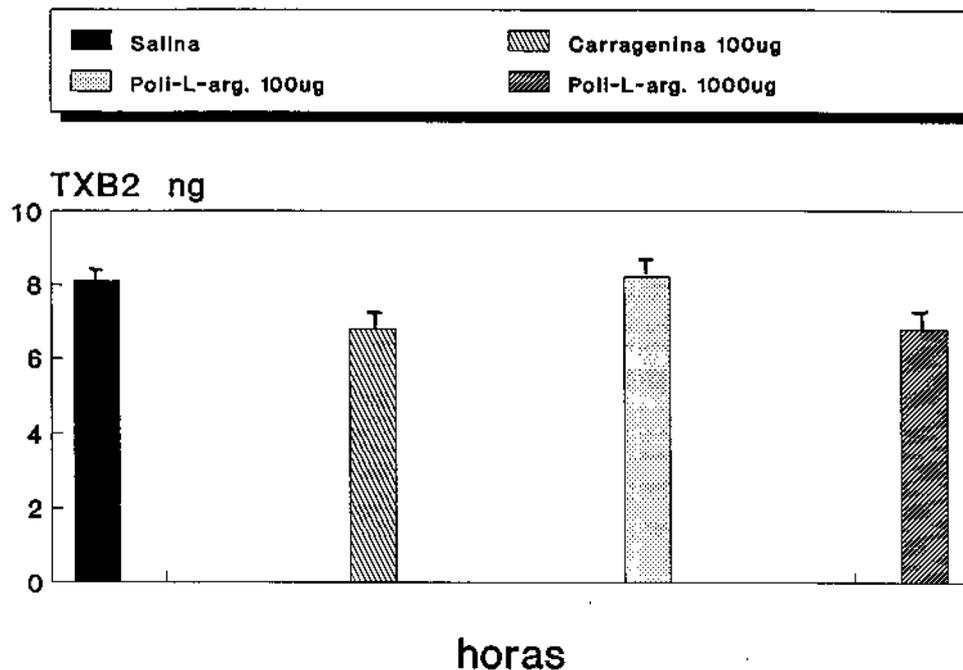


FIG XVI- NÍVEIS DE TXB₂ NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD. CURVA DOSE-RESPOSTA.

A poli-L-arginina 24KD (100 e 1000ug/0.1ml) e salina (0.1ml) foram introduzidos no espaço pleural e os níveis de TXB₂ foram analisados no exsudato pleural produzido 6 horas após a injeção intrapleural. Os níveis de TXB₂ foram expressos como TXB₂ total em ng.

FIG XVI-B

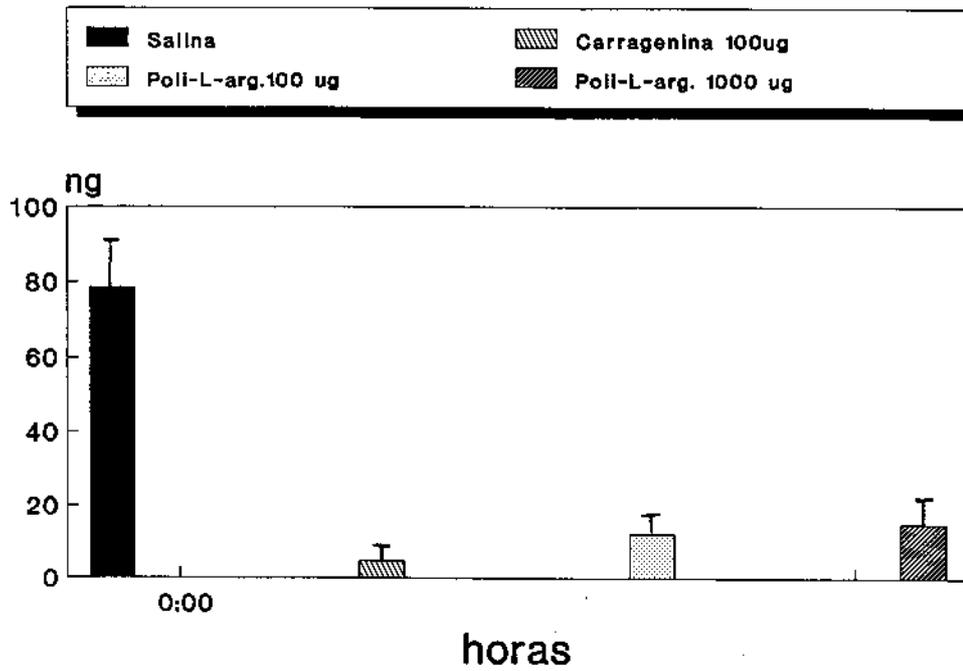


FIG XVI- NÍVEIS DE 6-oxo-PGF₁α NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD. CURVA DOSE-RESPOSTA.

A poli-L-arginina 24KD (100 e 1000ug/0.1ml) e salina (0.1ml) foram introduzidos no espaço pleural e os níveis de 6-oxo-PGF₁α foram analisados no exsudato pleural produzido 6 horas após a injeção intrapleural. Os níveis de 6-oxo-PGF₁α foram expressos como 6-oxo-PGF₁α total em ng.

FIG XVII-A

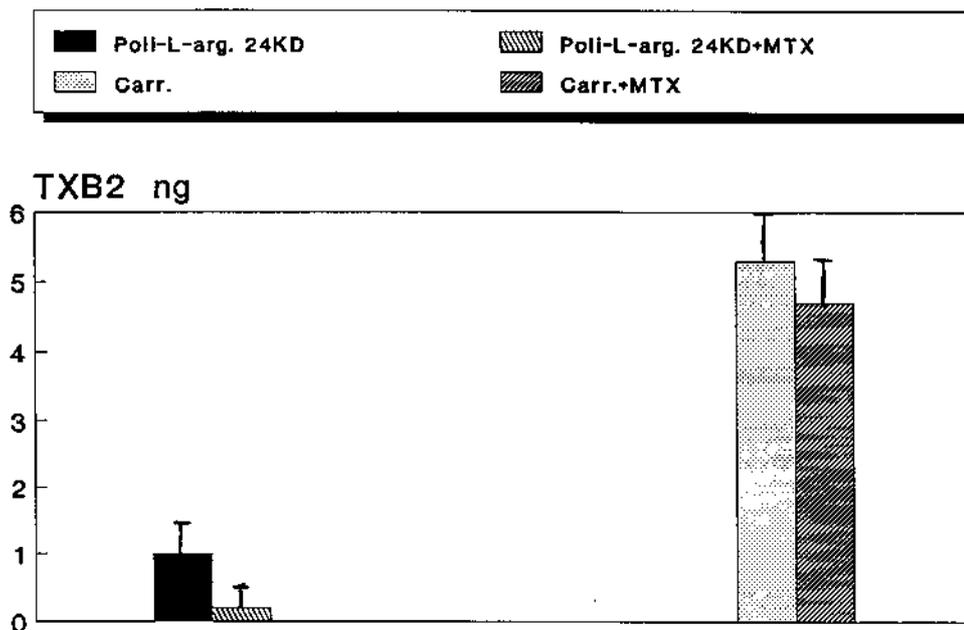


FIG XVII- NÍVEIS DE TXB₂ NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD. EFEITO DO METOTREXATO.

A poli-L-arginina 24KD (100 e 1000ug/0.1ml), carragenina (100ug/0.1ml) e salina (0.1ml) foram injetados no espaço pleural e os níveis de TXB₂ no exsudato pleural produzido foram avaliados 4 horas após a injeção intrapleural. Os níveis de TXB₂ foram expressos em TXB₂ total em ng.

FIG XVII-B

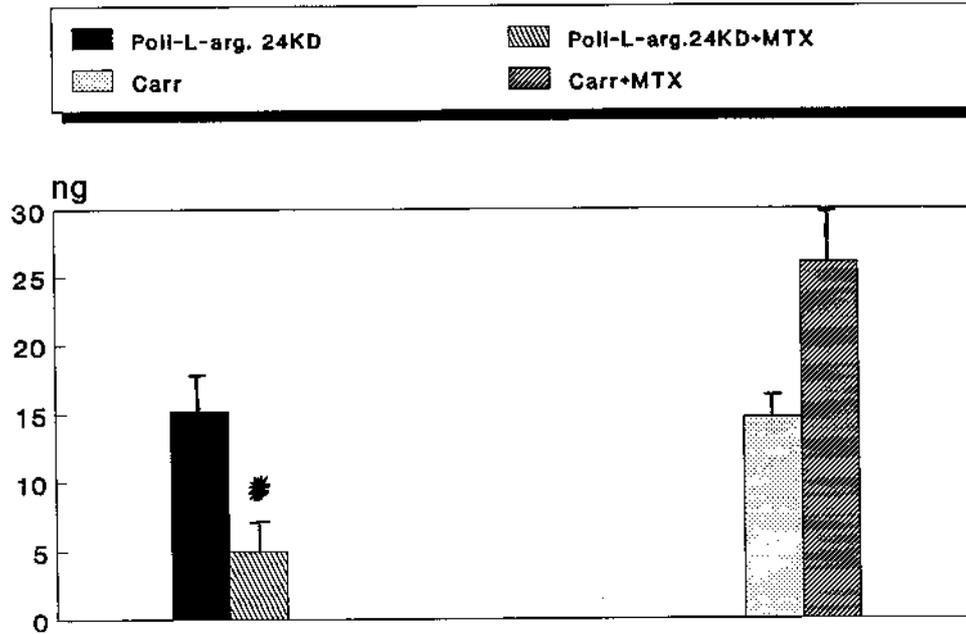


FIG XVII- NÍVEIS DE 6-oxo-PGF_{1α} NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLI-L-ARGININA 24KD. EFEITO DO METOTREXATO.

A poli-L-arginina 24KD (100 e 1000ug/0.1ml), carragenina (100ug/0.1ml) e salina (0.1ml) foram injetados no espaço pleural e os níveis de 6-oxo-PGF_{1α} no exsudato pleural produzido foram avaliados 4 horas apos a injeção intrapleural. Os níveis de 6-oxo-PGF_{1α} foram expressos em 6-oxo-PGF_{1α} total em ng.

FIG XVIII

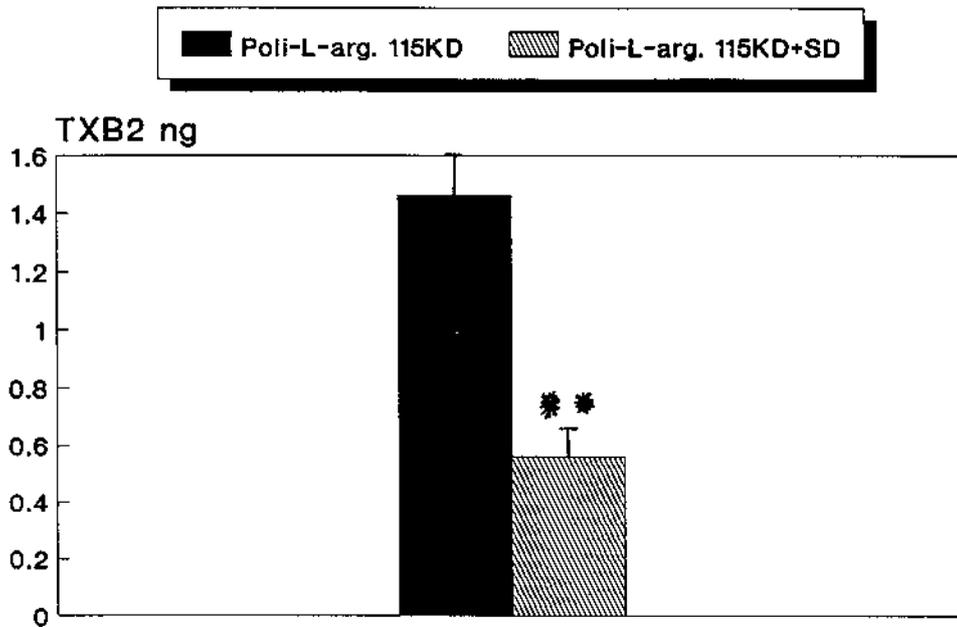


FIG XVIII- NÍVEIS DE TXB₂ NA PLEURISIA INDUZIDA POR POLIARGININA. EFEITO DO SULFATO DE DERMATAM.

A poli-L-arginina 115KD (1mg/0.1ml) e poli-L-arginina (1mg) + sulfato de dermatam (1.5mg) (volume 0.1ml) foram injetados na cavidade pleural e os níveis de TXB₂ foram analisados no exsudato formado 4 horas após. (** p < 0.01)

III-2-8 Radioimunoensaio

Os níveis basais de TXB₂ e 6oxoPGF_{1α} total (concentração X volume) em ng da cavidade pleural foram obtidos após lavagem da cavidade pleural (TXB₂: 6.0±2.4; 6oxoPGF_{1α}: 11.7±2.4; n=5).

A FigXVa,b mostra os resultados dos níveis de TXB₂ e 6oxoPGF_{1α} na pleurisia induzida pela poliarginina 24 e 115KD (1mg/pleura), carragenina (100ug/pleura) e níveis basais (lavagem das cavidade pleural com 2 ml de tampão). Os níveis de TXB₂ diminuíram com o tempo na pleurisia induzida com poliarginina 115KD (p<0.01). Os níveis de 6oxoPGF_{1α} apresentaram perfil semelhante (p<0.001). A pleurisia induzida por poliarginina 24KD apresentou queda nos níveis de TXB₂ da 1ª para a 6ª hora (p<0.001), e nos níveis de 6oxoPGF_{1α} (p<0.005).

A curva dose-resposta na pleurisia induzida pela poliarginina 24KD (100, 300, e 1000ug/pleura), mostrou queda nos níveis de TXB₂ na administração da dose de 300ug/pleura (p<0,01). Análise realizada 6 horas após a injeção intrapleural de poliarginina. FigXVIa,b.

A pleurisia induzida por poliarginina 24KD (1mg/0.1ml/pleura) em animais depletados de PMN mostrou uma queda nos níveis de 6oxoPGF_{1α} total (p<0.05). Análise realizada 4 horas após a introdução de poliarginina intrapleural. A pleurisia induzida com carragenina (100ug/pleura/0.1ml) não alterou os níveis dessas prostaglandinas após a depleção de PMN dos animais. Análise realizada em 4 horas. Fig.XVIIa,b.

A administração da mistura de sulfato de dermatam (1.5mg) e poli-L-arginina115KD (1mg), diminuiu os níveis de TXB₂ no exsudato pleural (p<0.01). Análise em 4 horas. Figura XVIII.

III-3 Conclusão e Discussão

A via de acesso da poliarginina nos animais foi fator fundamental na determinação da leucocitose em sangue periférico, a mesma dose de poliarginina por via pleural suscitou leucocitose precoce, como observado na administração de polications iv. O aumento de leucócitos PMN no sangue periférico ocorreu após o aumento de leucócitos circulantes, quando o número total de leucócitos periféricos já retornou a níveis basais. A administração de salina ou poliarginina intrapleural causou uma elevação dos leucócitos circulantes provavelmente devido a manipulação cirúrgica.

Os polications demonstraram ser agentes capazes de induzir pleurisia em ratos com a característica de produzir um grande volume de exsudato sem hemorragia. Quanto a celularidade foi um fenomeno de menor importância quando comparado a pleurisia induzido por outros agentes como a carragenina.

A pleurisia induzida por polications não mostrou ser dependente do tamanho molecular das poliargininas na dose de 1mg/pleura. A utilização de doses menores de poliarginina (300ug) também não apresentou relação carga-tamanho-molecular dependente, pois doses grandes poderiam desencadear uma resposta máxima, mascarando a relação efeito-carga. A pleurisia induzida pela poliarginina de menor peso molecular (24KD) sempre apresentou tendência a causar maior migração celular para a cavidade pleural que a poliarginina de maior peso molecular (115KD).

A utilização de poli-L-lisina (85KD) de tamanho molecular superior a poli-L-arginina (24KD) não mostrou diferença na resposta a pleurisia, sugerindo que a resposta observada a poliarginina se deva principalmente a sua propriedade catiônica, e não a características específicas de sua molécula.

A migração celular para a cavidade pleural foi pequena quando comparada a outros agentes empregados no modelo da pleurisia. Tal fato provavelmente ocorre devido a distensão pleural causada pela grande quantidade de volume de exsudato na cavidade pleural após a pleurisia induzida por polications. A introdução de 2 ml de salina na cavidade pleural levou a uma migração celular importante na sexta hora do experimento, mesmo quando comparado a agentes que causam grande migração para a cavidade pleural como a carragenina. Na sexta hora do experimento a pleura do animal já havia reabsorvido 60% do volume de salina injetado.

O leucócito PMN é essencial para a resposta de alteração de permeabilidade a substâncias leucotácicas, como C5a, LTB₄, e FMLP (substância sintética baseada em peptídeos formil secretados por bactérias) (Williams & Jose, 1981; Samuelsson *et al.*, 1979; Schiffmann *et al.*, 1975) Animais depletados de PMN não produzem edema em pele, mesmo na presença de PGE₂ (Wedmore & Willams, 1981). A migração celular para a cavidade pleural na pleurisia induzida por polications foi constituída principalmente por leucócitos PMN. A depleção de PMN levou a uma redução no volume de exsudato produzido na migração celular. Esses resultados indicam que a alteração de permeabilidade que leva a produção de exsudato pleural induzida por polications e dependente dos PMN.

Estudos em modelo de inflamação em animais, como exemplo o edema de pata em rato, sugerem que a resposta vascular aguda (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) resulta na liberação de mediadores de baixo peso molecular: histamina, 5-HT, bradicinina e prostaglandinas (Di Rosa *et al.*, 19712). Wedmore & Willams (1981) demonstraram que o edema induzido por histamina em pele de coelho não é afetado quando os animais são depletados de PMN. Bloqueadores de histamina e 5-HT reduziram o volume de exsudato pleural na pleurisia induzida por polications nas primeiras horas do experimento. Essa resposta aos bloqueadores já era esperada uma vez que substâncias catiônicas como o composto 48/80 degranulam o mastócito (Kazimierczak & Diamond, 1978). É descrito que em ratos a histamina tem pequena participação na alteração da permeabilidade vascular (Rowley & Benditt, 1956; Wilhelm *et al.*, 1962) porém a resposta inflamatória na pleurisia induzida por poliarginina foi reduzida pelo bloqueador de histamina, a mepiramina. A migração celular não foi afetada com a utilização desses bloqueadores. a dose dos bloqueadores foi eficaz, pois houve bloqueio do volume de exsudato e da migração celular na pleurisia induzida pelo composto 48/80.

Quando os animais foram depletados de histamina e serotonina a redução no volume de exsudato foi maior, e houve inibição da migração celular.

Durante um estímulo inflamatório ou imunológico a superfície do mastócito é estimulada e ocorre liberação dos grânulos contendo amins catiônicas como a histamina e substâncias aniônicas como a heparina. Pensa-se que a heparina seja armazenada juntamente com essas amins para a prevenção da difusão da histamina, através de ligação iônica (Scully *et al.*, 1986). Estudos de polications *in vitro* demonstram liberação de metabolitos da cicloxigenase em cultura de células endoteliais de aorta, fibroblastos e célula epitelial glomerular (Needham *et al.*, 1988; Shier *et al.*, 1984, 1986; Pugliese *et al.*, 1987). O processo inflamatório desencadeado pelos polications no espaço pleural não é afetado pelos

mediadores derivados dos metabolitos da cicloxigenase. A indometacina não reduziu o volume ou celularidade no exsudato pleural. A dose utilizada foi eficaz, uma vez que houve inibição na pleurisia induzida por carragenina. A pleurisia induzida por polications apresentou uma redução nos níveis de TXB₂ e 6oxoPGF_{1α} tempo-dependente, porém não dose dependente. Os níveis de 6oxoPGF_{1α} sempre foram inferiores ao basal da cavidade pleural, e foram reduzidos durante experimentos em que os animais foram depletados de PMN. A mistura sulfato de dermatam + poliarginina foi capaz de reduzir a quantidade de TXB₂ no exsudato pleural. Ao contrário de estudos com polications em cultura de células, estes experimentos in vivo demonstram que as prostaglandinas estão diminuídas, e que bloqueadores da cicloxigenase não afetam a evolução do processo inflamatório.

Provavelmente a mistura de poliarginina e sulfato de dermatam seja um fator irritante na cavidade pleural, uma vez que a administração desse agente anticoagulante, heparina 50U, na cavidade pleural não aumentou a migração dos leucócitos. É descrito que a administração intravenosa de heparina reduz o edema de pata induzido pela carragenina, ação esta decorrente da diminuição da formação de fibrinogênio (Wiseman & Chang, 1969). Hanahoe & Jones (1988), supõe que a redução do edema de pata induzido pela carragenina seja decorrente da diminuição do fator de Hageman, uma vez que a heparina já apresenta a característica de diminuir o fibrinogênio. Antunes *et al.*, 1990, também observaram inibição do edema de pata induzido por polications após a administração de heparina iv. A utilização de heparina na pata juntamente com o polication aboliu em maior grau a resposta inflamatória através do aumento de sítios aniônicos na superfície endotelial vascular. A superfície do endotélio vascular e a membrana basal glomerular (Skultelsky *et al.*, 1975; Simionescu *et al.*, 1981; Barnes *et al.*, 1984) contém sítios aniônicos. A heparina aboliu o volume de exsudato produzido na pleurisia induzida por polications quando dada localmente, possivelmente por interação de cargas com os polications. Esses resultados sugerem que a superfície pleural possui sítios aniônicos.

Capítulo IV
Edema de Pulmão

IV - Edema de Pulmão

IV-1 Introdução

IV-1-1 Anatomia Pulmonar

I- Epitélio Pulmonar. O epitélio alveolar é formado por uma delgada camada de células escamosas, células tipo I, que ocupam 95% da área total da superfície alveolar, e células cubóides, tipo II, que recobrem pequena área na superfície do alvéolo. Um terceiro tipo celular, mais raro, encontrado nessa superfície, as células em escova, localizadas próximo ao bronquíolo terminal (Weibel *et al.*, 1976). As células epiteliais apresentam-se como uma camada ininterrupta, através de ligações chamadas "zonulae occludentes". O epitélio é impermeável a moléculas grandes, como proteínas plasmáticas (Taylor, 1970), e permeável a água (Gee & Staub, 1977).

II- Endotélio Capilar. Comparado a "zonulae occludentes" do epitélio pulmonar, as junções do endotélio capilar são relativamente menos potentes (Chinard *et al.*, 1962; Schneeberger & Karnovsky, 1976). O endotélio dos capilares pulmonares são os únicos 2-3 vezes mais permeáveis a moléculas solúveis em água que os endotélios de outros órgãos (Renkin, 1964), sendo altamente permeável a proteínas plasmáticas (Landis & Pappenhiner, 1963). Além da passagem direta através da membrana plasmática, água e solutos podem passar através do endotélio por fendas intercelulares e canais na membrana celular de cada lado do endotélio (Simionescu *et al.*, 1975). Está claro que constitui a principal barreira para a entrada de proteínas para o espaço alveolar e o epitélio pulmonar (Brigham *et al.*, 1974). Na superfície luminal do endotélio encontramos mosaicos de microdomínios aniônicos (Pietra *et al.*, 1983).

III- Espaço Intersticial. Na região em que as membranas basais do endotélio e epitélio se encontram há fusão, com formação de uma única camada. Esta é a região fina. Na região espessa, em que encontramos duas camadas de membrana basal, existe um tecido conjuntivo, destinado à sustentação dos capilares. A partir do alvéolo, o interstício é ocupado por mucopolissacarídeos, especialmente o ácido hialurônico, que apresenta a função de diminuir a difusão de moléculas pequenas e água, ajudando também na elasticidade desse meio (Harris & Health, 1986).

IV-1-2 Sítios Aniônicos na Barreira Alvéolo-capilar

No trajeto em que o epitélio pulmonar está em contato com o capilar pulmonar a membrana basal é única, e constituída por 3 camadas de densidades diferentes a microscopia eletrônica. A camada lamina rara, que está em contato com o epitélio pulmonar e contém maior densidade de sítios aniônicos que a lâmina rara em contato com as células endoteliais (Vaccaro & Brodi, 1981). Na região em que a lâmina basal é dupla, encontramos uma camada de tecido conjuntivo composta por proteoglicanos e glicoproteínas de alto peso molecular. A maior parte dos proteoglicanos contém grande quantidade de sulfato e são

altamente aniônicos (Pietra, 1984). A superfície do alvéolo pulmonar é coberta por uma camada de glicocalix rico em glicoproteínas aniônicas (Kuhn, 1968).

IV-1-3 Modelos Animais

Uma grande variedade de modelos animais têm sido utilizada para a reprodução da SARA (síndrome da angustia respiratória do adulto), a administração da toxina do antrax (Beal & Dalldorf, 1966), enterotoxina estafilocócica (Finegold *et al.*, 1967), endotoxina (Borg *et al.*, 1985; Brigham & Meyrick, 1986), α -naftil-tiuréia (Richter *et al.*, 1945), adrenalina (Stone & Loew, 1949), aloxana (Cotrell *et al.*, 1967), soluções ácidas (Alexander, 1968), indução de hipoxia (Kish, 1965), instilação de água salgada e doce (Reibord and Spitz, 1966), pneumonias virais (Plummer & Stone, 1964), sulfato de amônia intraperitoneal (Hayes & Shiga, 1970), diálise com membrana de celofane (Craddock *et al.*, 1977), introdução de complemento intratraqueal (Larsen *et al.*, 1980), etichlorvinil (Fisher *et al.*, 1977).

IV-1-4 Mediadores

Desde a descrição da SARA que se procura os mediadores responsáveis pela sua fisiopatologia. A correlação entre o início do edema pulmonar e alteração nos mediadores seria de extrema importância, pois mediadores funcionariam como marcadores precoces da doença.

- 1- A histamina leva ao aumento da permeabilidade pulmonar mesmo em pequenas doses (Brigham & Owen, 1975).
- 2- A serotonina não altera a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, mas aumenta a pressão hidrostática capilar devido a contração da artéria pulmonar e pequenas veias pulmonares (Brigham & Owen, 1975).
- 3- O papel da bradicinina na patogênese do edema de pulmão não está bem estabelecido, e apesar de causar um aumento da permeabilidade em capilares sistêmicos esse efeito não foi observado na circulação pulmonar. A perfusão de pulmão isolado com bradicinina leva a discreto edema (Lewis *et al.*, 1963).
- 4- O fator de necrose tumoral por via sistêmica em altas doses aumenta a permeabilidade pulmonar levando a formação de edema de pulmão (Stephens *et al.*, 1988).
- 5- Em modelos de SARA em carneiro, com endotoxina, a administração de N-acetilcisteína atenuou o aumento da pressão arterial pulmonar, a resistência vascular, e preveniu a queda do fluxo cardíaco (Bernard *et al.*, 1984).
- 6- A leucocitose observada durante a hemodiálise em humanos é devida ao sequestro de PMN no pulmão (Craddock *et al.*, 1977). O PMN é recrutado para o pulmão durante o edema pulmonar possivelmente por dois mecanismos: liberação de fatores quimiotáticos através dos macrófagos alveolares (Kasmierowski *et al.*, 1978) e fatores derivados do complemento (C5a) (Larsen *et al.*, 1980).
- 7- As prostaglandinas aumentam o conteúdo proteico da drenagem linfática pulmonar, porém acredita-se que este aumento ocorra devido ao aumento da

pressão hidrostática, secundária à administração das prostaglandinas. As prostaglandinas não alteram a permeabilidade microvascular pulmonar (Bernard & Brigham, 1986).

- 8- Substâncias catiônicas causam edema e vasoconstrição pulmonar que são bloqueados com agentes aniônicos (Chang *et al.*, 1987).

IV-1-5 SARA

A síndrome da angustia respiratória do adulto (SARA) tem sido aceita como uma categoria clínica desde a época passada. Porém encontram-se relatos de síndromes semelhantes desde 1914, quando W. Pasteur relata um caso de colapso pulmonar maciço devido a falência da capacidade inspiratória. Durante a 1ª Grande Guerra Mundial os médicos do exército descrevem o colapso pulmonar maciço após trauma em outras regiões extra-pulmonares. Posteriormente, em 1945,

Bradford, apresenta a teoria que a síndrome se iniciaria em uma pequena área pulmonar e então se expandiria por todo pulmão, e denominou a síndrome de "wet lung". A melhoria do atendimento médico durante a 2ª Grande Guerra Mundial, fez com que a sobrevivência dos soldados em choque aumentasse, e o número de casos decorrente do colapso pulmonar maciço aumentou, agora denominado "traumatic wet lung". Durante a guerra do Vietnã a ressuscitação dos soldados com fluído já se iniciava no campo de batalha, a incidência da SARA aumentou ainda mais. As autopsias gerais revelavam 89% dos soldados mortos apresentavam aumento no peso pulmonar (Connors *et al.*, 1981).

Ashbaugh (1967), descreve 12 pacientes que apresentavam dispnéia, hipoxemia não responsiva ao oxigênio, perda da complacência pulmonar, e opacificações pulmonares ao radiograma pulmonar. A doença de base variava desde infecção viral ao trauma grave. A autopsia de 7 desses pacientes revelou um pulmão edemaciado, com aumento de peso, hiperemia, aumento de diâmetro dos capilares pulmonares, hemorragia intersticial e alveolar, e 6 pacientes apresentavam membrana hialina. Os achados eram muito semelhantes aos de neonatos com síndrome da angustia respiratória, e Ashbaugh denominou essa entidade de síndrome da angustia respiratória do adulto (Ashbaugh *et al.*, 1967).

A taxa de mortalidade atual em pacientes com SARA é de 60-70% e não mudou desde que a síndrome foi descrita, apesar da melhora das condições nos centros de terapia intensiva.

IV-1-6 Objetivo

O objetivo deste capítulo é descrever o efeito da administração de substâncias catiônicas intratraqueal, e seus prováveis mediadores.

IV-2 Material e Métodos

IV-2-1 Animais

Foram utilizados ratos machos (Wistar, 250-400g), para os seguintes experimentos: hemograma do sangue periférico, edema de pulmão, determinação da sobrevida dos animais, LBA e histologia. Também foram utilizados coelhos (New-Zealand, 2,5Kg), cobaias (Linhagem inglesa 300-400 g) e camundongo (Swiss, 30-40g) para a análise histológica.

IV-2-2 Métodos

O índice pulmonar seco-úmido foi determinado após a indução do edema de pulmão. Em amostras do LBA determinou-se a concentração proteica e os níveis de TXB₂ e 6oxoPGF_{1α}.

IV-2-3 Tratamento

Os ratos foram tratados previamente com o composto 48/80 para a depleção de histamina e serotonina, e depletados de PMN através da utilização de metotrexato.

IV-3 Resultado

IV-3-1 Frequência Respiratória

Após a injeção intratraqueal de 1 mg (1mg/ml) de poli-L-arginina 115KD, os animais apresentaram aumento da frequência respiratória (134.7 ± 3.86 ; n = 8; p < 0.001), em relação aos que receberam salina (1ml/TT) (87.4 ± 0.94 ; n = 7).

IV-3-2 Hemograma

A administração de poli-L-arginina 115KD (1mg/TT) em ratos causou uma leucopenia em sangue periférico na primeira hora após a indução do edema de pulmão. A Fig I mostra os resultados do número de leucócitos periféricos em animais que receberam poli-L-arginina 115KD (1mg/ml/TT) e em animais que receberam salina (1ml/TT).

IV-3-3 Sobrevida dos Animais

O edema de pulmão foi induzido em tres grupos de animais, através da injeção de 1 ml da solução de poli-L-arginina diluido em salina: 1) 115KD (1mg/TT); 2) 24KD (1mg/TT); 3) Grupo controle com salina (1ml/TT). Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida em cada grupo FigII.

FIG I

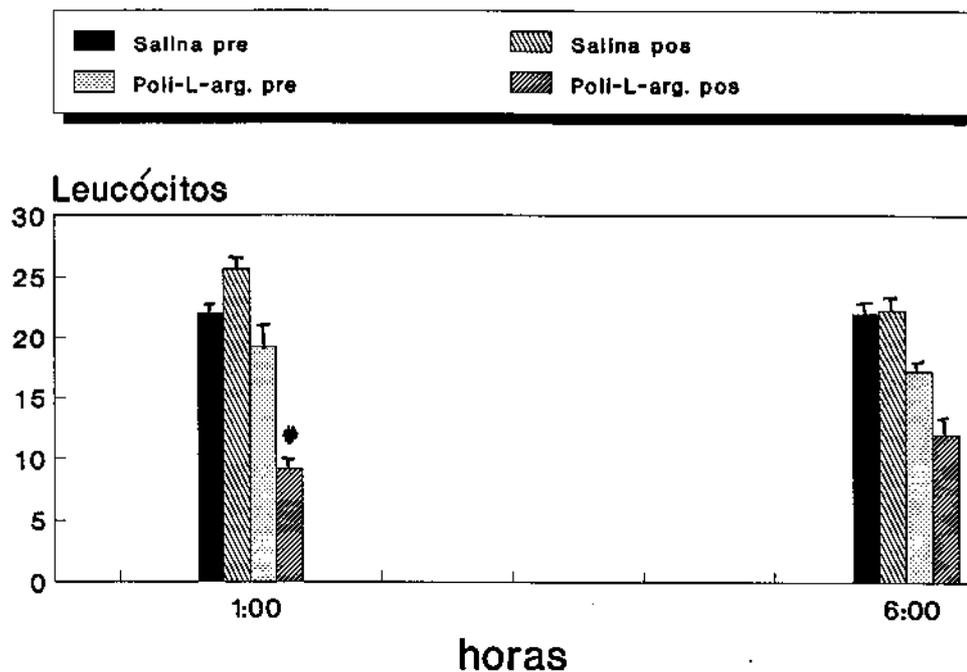


FIG I- EFEITO DA POLI-L-ARGININA INTRATRAQUEAL NOS LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS.

A poli-L-arginina 115KD (1mg/1ml)₃ e salina (1ml), foram injetas pela via intratraqueal e o número de leucóцитos (leucóцитos mm³ x 10⁶) analisado pré injeção e após 1, 4, 6, 12 e 24 horas. (n = 3 para cada grupo. ** p < 0.001).

FIG-II

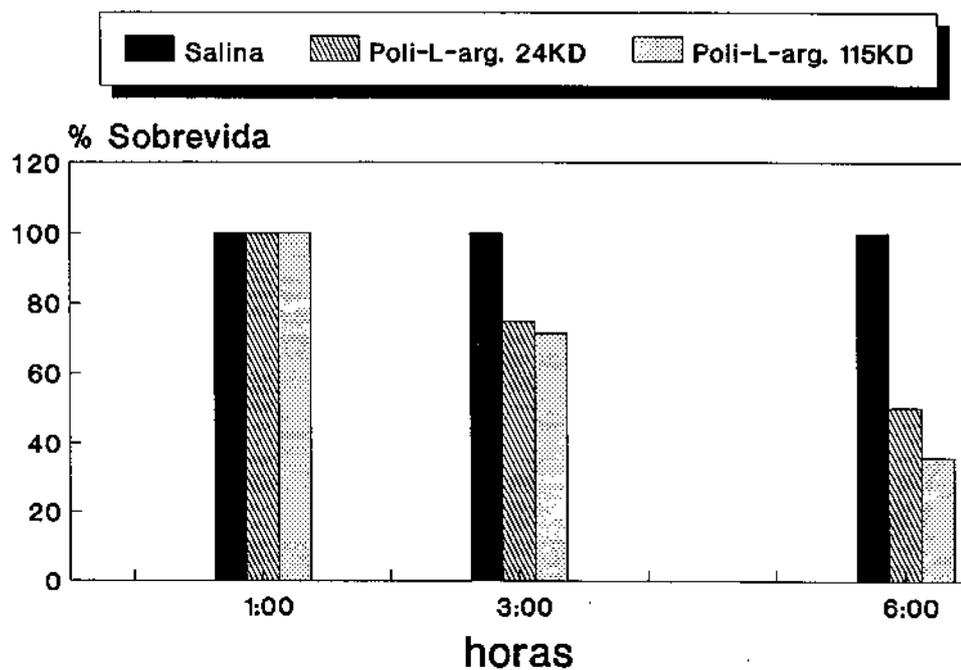


FIG II- EFEITO DA POLI-L-ARGININA INTRATRAQUEAL NA SOBREVIDA DOS ANIMAIS.

A poli-L-arginina 24 e 115KD, (1mg/1ml), e salina (1ml) foram injetados pela via traqueal e a sobrevivência dos animais avaliada 1, 3 e 6 horas após. (24KD 1h:n = 5, 3h:n = 12, 6h:n = 12; poli.115KD 1h:n = 19, 3h:n = 7, 6h:n = 28; salina 1h:n = 14, 3h:n = 9, 6h:n = 13).

IV-3-4 Índice Pulmonar Seco-úmido

O edema de pulmão foi induzido através da injeção intratraqueal de poli-L-arginina 24KD (1mg/ml), e um grupo controle recebeu salina (1ml/IT). O índice pulmonar seco-úmido foi analisado 1,4 e 6 horas após a injeção IT. A figIII mostra que o índice pulmonar nos grupos que receberam poliarginina foram menores que aqueles produzidos pela salina, ou seja, houve edema pulmonar, durante todo o experimento.

O índice pulmonar seco-úmido foi também realizado após o LBA, e não houve diferença significativa entre o grupo controle com salina, e o grupo tratado com poli-L-arginina 115KD (1mg/IT).

IV-3-5 Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA nos animais que receberam poli-L-arginina 115KD (1mg/IT) foi analisado 1, 4, e 6 horas após a injeção IT. O volume recuperado diferiu significativamente do controle durante todo experimento. Fig.IV-A

O número de leucócitos no LBA aumentou (Fig. IV-B) em relação aos animais que receberam salina (IT), a partir da 4ª hora, com um pico na 6ª hora. Esse aumento celular ocorreu principalmente pelo aumento de PMN, na 6ª hora onde o número de leucócitos e máximo, a porcentagem de PMN atinge 80% das células constituintes do LBA. Fig. IV-C.

O aumento na migração celular foi tempo dependente (1h $15.3 \pm 4.7 \times 10^6$; 6h $51.5 \pm 1.9 \times 10^6$; $p < 0.01$).

IV-3-6 Efeito da Poliarginina Intravenosa no LBA

Com o objetivo de avaliar o efeito da poliarginina intravenosa na celularidade do LBA, animais foram injetados com 1 mg de poli-L-arginina 115KD (iv/0.4ml) e introduzido salina IT (1ml). Um grupo controle recebeu salina (1ml) IT e salina iv (0.4ml). A poliarginina por via endovenosa não alterou a celularidade do LBA, Fig V. O número de células no LBA diferiu significativamente no grupo que recebeu poliarginina IT na sexta hora.

IV-3-7 Comparação das Cargas de Policações no LBA

Comparou-se a poli-L-arginina 24 e 115KD (1mg/IT), e poli-L-lisina 2 KD (1mg/IT) com salina (1ml/IT). O experimento foi realizado 3 horas após a injeção IT. Fig VI-A e B. A poli-L-arginina 115KD apresentou maior migração celular que a de menor peso molecular ($p < 0.01$)

IV-3-8 Curva Dose-resposta no Edema de Pulmão Induzido por Poliarginina

A utilização de concentrações crescentes de poli-L-arginina 24KD, Fig. VI-ABCD, na indução do edema de pulmão mostrou um aumento na mortalidade dos animais. Houve aumento da migração celular para o espaço alveolar relacionado ao aumento da dose (100-1000ug), em experimentos analisados 3 horas após a injeção IT. A porcentagem de

FIG III

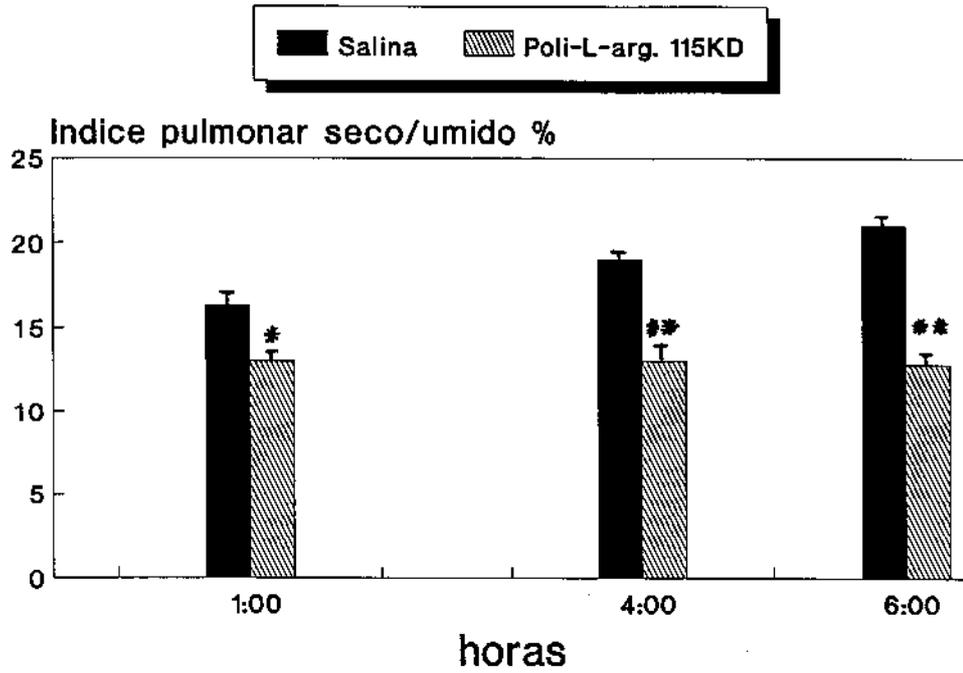


FIG III- EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO POR POLI-L-ARGININA. ÍNDICE PULMONAR SECO-ÚMIDO (%).

A poli-L-arginina 115KD (1mg/1ml) e salina (1ml) foram injetados pela via traqueal e o edema de pulmão mensurado 1, 4 e 6 horas após. (Poli. 6h: n=6; n=5 para os grupos restantes. *** p < 0.001).

FIG IV-A

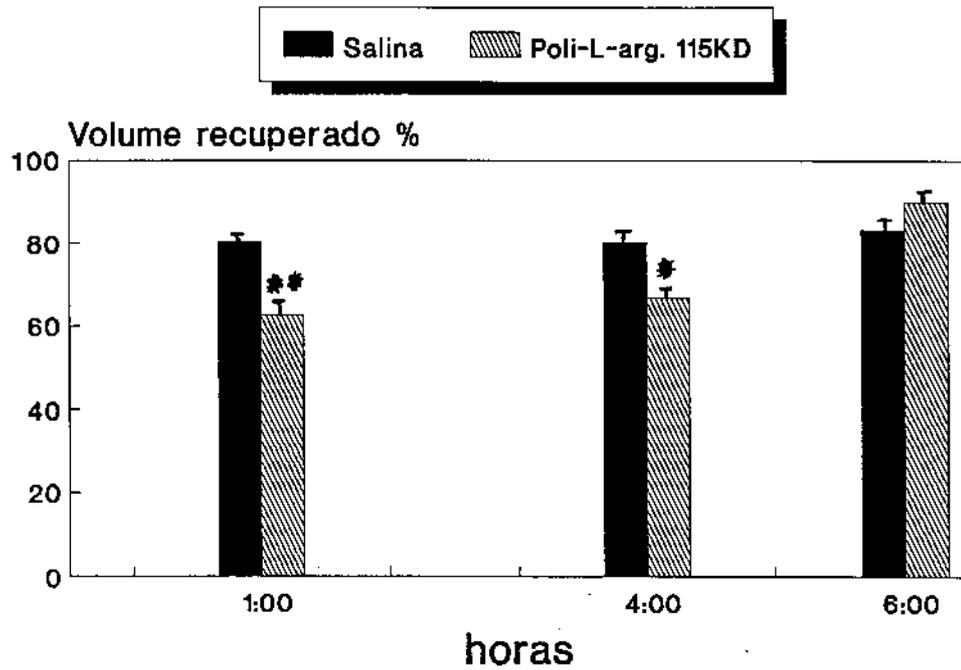


FIG IV- EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO POR POLI-L-ARGININA. EFEITO NO LBA.

A Poli-L-arginina 115KD (1mg/1ml) e salina (1ml) foram injetados pela via traqueal e a porcentagem do volume recuperado foi mensurado 1, 4 e 6 horas após. (Poli. 1h:n = 5, 4h:n = 3, 6h:n = 2; salina 1h:n = 5, 4h:n = 4, 6h:n = 5). (** p < 0.01; *** p < 0.001.)

FIG IV-B

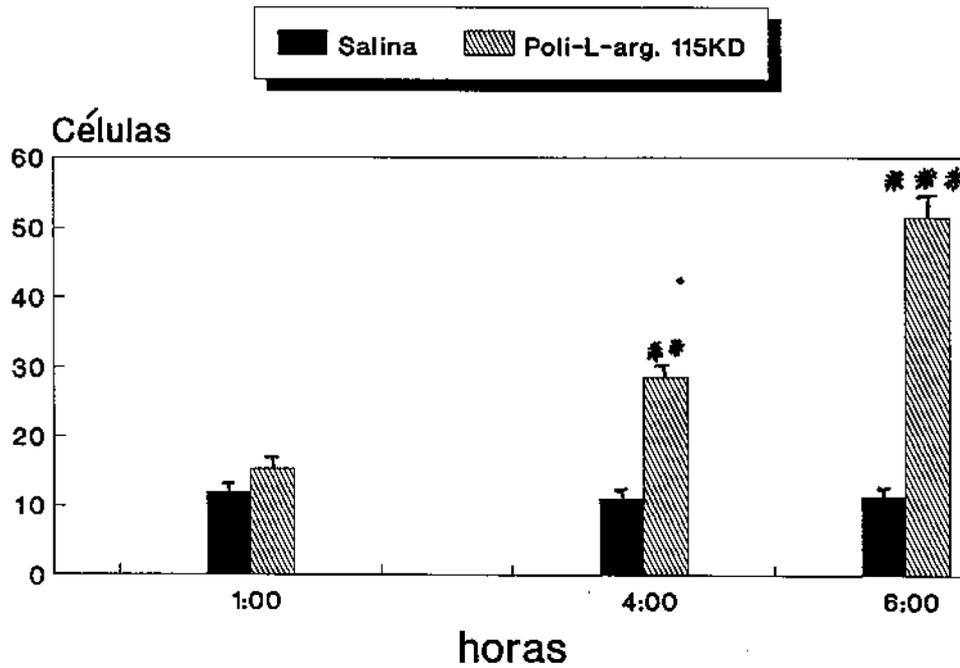


FIG IV- EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO POR POLI-L-ARGININA. EFEITO NO LBA.

A Poli-L-arginina 115KD (1mg/1ml) e salina (1ml) foram injetados pela via traqueal e a celularidade avaliada 1, 4 e 6 horas após. A celularidade foi expressa como células totais $\times 10^6$. (Poli. 1h:n=5, 4h:n=3, 6h:n=2; salina 1h:n=5, 4h:n=4, 6h:n=5). (** p < 0.01; *** p < 0.001).

FIG IV-C

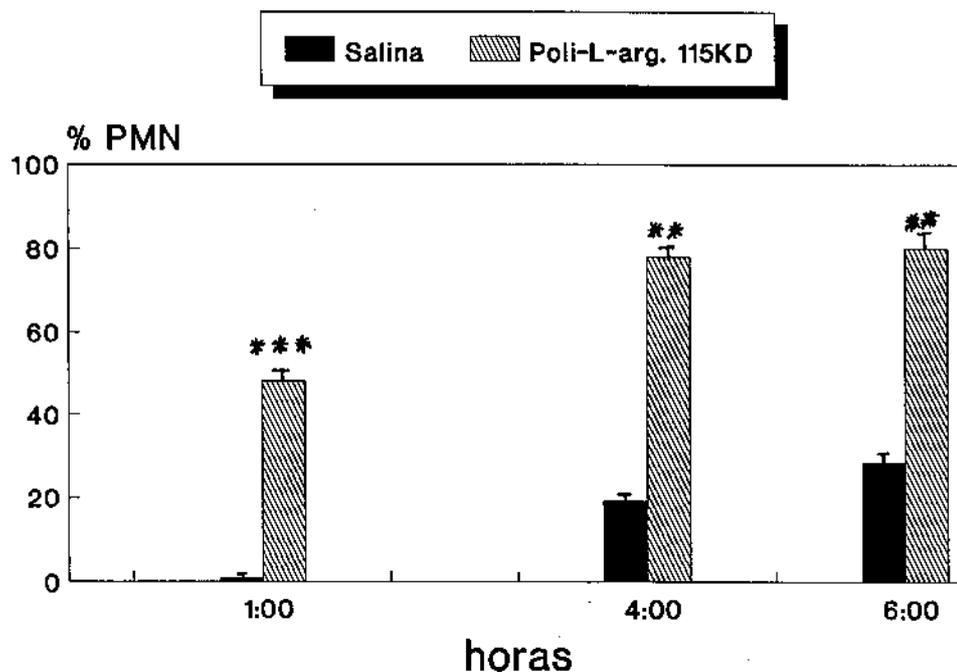


FIG IV- EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO POR POLI-L-ARGININA. EFEITO NO LBA.

A Poli-L-arginina 115KD (1mg/1ml) e salina (1ml) foram injetados pela via traqueal e a porcentagem de PMN da celularidade do LBA foi avaliada 1, 4 e 6 horas após. (Poli.1h:n = 5, 4h:n = 3, 6h:n = 2; salina 1h:n = 5, 4h:n = 4, 6h:n = 5). (** p < 0.01).

FIG V

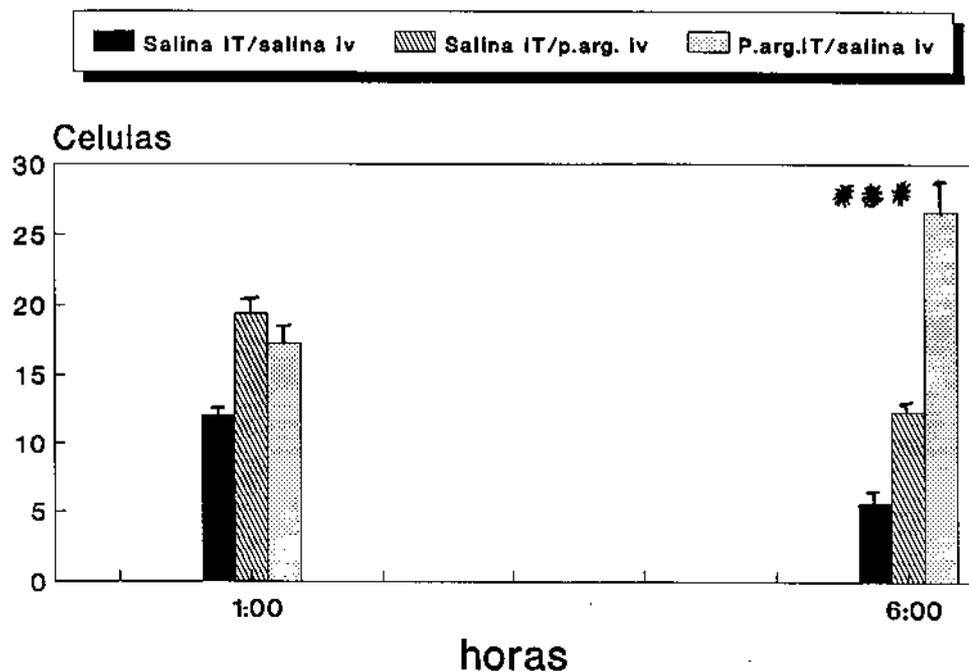


FIG V- EFEITO DA POLI-L-ARGININA INTRAVENOSA NO LBA.

Grupo I: Poli-L-arginina 115KD 1mg/0.4ml/iv e salina 1ml/IT. Grupo II: salina 0.4ml/iv e salina 1ml/IT. Grupo III: Salina 0.4ml/iv e poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT. A celularidade foi avaliada 1 e 6 horas após, e expressa como células totais $\times 10^6$. *** $p < 0.001$.

FIG VI

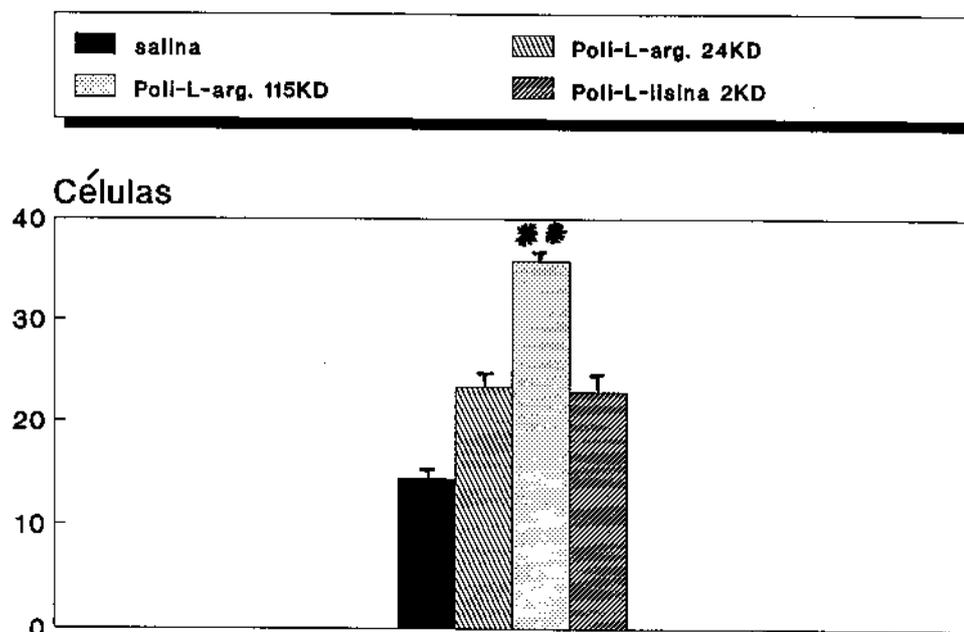


FIG VI- COMPARAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS POLICÁTIOS NO EDEMA DE PULMÃO. Poli-L-arginina 24 e 115KD 1mg/1ml/IT, e poli-L-lisina 2KD 1mg/1ml/IT, salina 1ml/IT. A celularidade foi avaliada após 3 horas, e expressa como células totais x 10⁶. (Poliarginina 115KD n = 4, poliarginina 24KD n = 5, polilisina n = 5, salina n = 4). * p < 0.05, ** p < 0.01.

PMN no LBA aumentou com a utilização de doses maiores. A poli-L-arginina 24KD (500ug/IT) mostrou maior migração celular que doses menores (100ug/IT), em experimentos realizados 24 horas após. No grupo que recebeu poli-L-arginina 24KD (2mg/IT), o experimento foi realizado em 90 minutos para evitar o sofrimento dos animais. Em relação a poli-L-arginina 115KD houve a mesma relação dose-resposta ao número de células que migraram para o espaço alveolar em experimento realizado 3 horas após (poli-L-arginina 115KD 1mg/IT 12.7 ± 1.7 ; poli. 300ug/IT 12.4 ± 1.0 ; poli. 100ug/IT $7.7 \pm 0.39 \times 10^6$; $p < 0.001$). Fig VII.

IV-3-9 Neutralização de Cargas

Verificou-se o efeito da neutralização da poli-L-arginina 115KD (1mg/IT) através da utilização de sulfato de dermatam (1.5mg + poliarginina 1mg). A mistura, formou um total de 1ml, e foi injetada IT. O experimento analisado 1,4 e 6 horas após a injeção IT.

A sobrevida, Fig. VIII, nos animais que receberam a mistura foi de 100% durante todo experimento, os animais que receberam apenas poli-L-arginina 115KD a sobrevida foi decrescente com o tempo (1h: 100%; 4h:50%; 6h: 25%).

IV-3-10 Proteínas

A quantidade de proteínas no LBA aumentou nos grupos que receberam poli-L-arginina 115KD. Para descartar a hipótese de um aumento proteico devido a presença da poli-L-arginina 115KD, construiu-se uma curva padrão com e sem a dose máxima que a poliarginina atingiria no LBA em cada amostra (10ug/100ul). Fig.IX. O aumento na concentração proteica do LBA foi tempo dependente, atingindo concentrações máximas na sexta hora após a injeção intratraqueal ($p < 0.01$). A fig X mostra os resultados das concentrações proteicas, no edema de pulmão induzido pela poli-l-arginina 115KD (1mg/IT) 1, 4 e 6 horas após.

A fig. XI mostra a concentração proteica na primeira hora no grupo que recebeu poli-L-arginina 115KD (1mg/IT), e nos grupos tratados com sulfato de dermatam (1.5mg/IT) durante todo o experimento (1, 4 e 6 horas). A quantidade proteica no LBA foi reduzida drasticamente na primeira hora quando comparada ao grupo que não recebeu sulfato de dermatam.

IV-3-11 Depleção de PMN

Houve uma redução no número de leucócitos circulantes após a depleção de PMN nos animais de 41% (pré: 13.8 ± 2.4 ; pós $8.1 \pm 1.4 \times 10^3/\text{mm}^3$; $n = 5$), e uma redução de 67.9% na porcentagem de leucócitos PMN (pré: 20.2 ± 2.6 ; pós: 6.5 ± 1.4 ; $n = 5$).

Utilizou-se como controle salina (1ml) IT, e um grupo recebeu somente poli-L-arginina 115KD (1mg/IT), e o terceiro grupo poli-L-arginina 115KD(1mg/IT) em animais previamente tratados com metotrexato, o experimento foi realizado 1,4 e 6 horas após a injeção IT. A Fig.XII-A mostra que os animais depletados de PMN apresentaram menor migração de leucócitos para o espaço alveolar, durante todo o experimento, porém sem redução na mortalidade dos animais quando comparado com os animais que receberam apenas poliarginina, Fig XII-B.

FIG VII-A

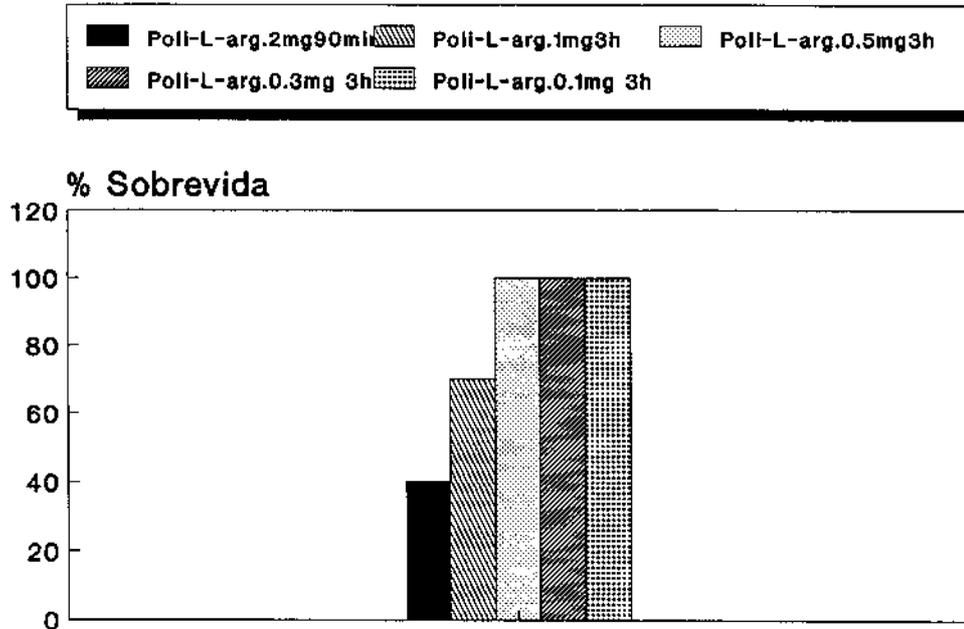


FIG VII- CURVA DOSE-RESPOSTA NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 24KD (100, 300, 500, 1000 e 2000ug/1ml/TT), salina 1ml/TT. (n = 5 para cada grupo). A sobrevida dos animais foi avaliada em 90 minutos para poli. 2mg, e em 3 e 24 horas para as demais doses.

FIG-VIIB

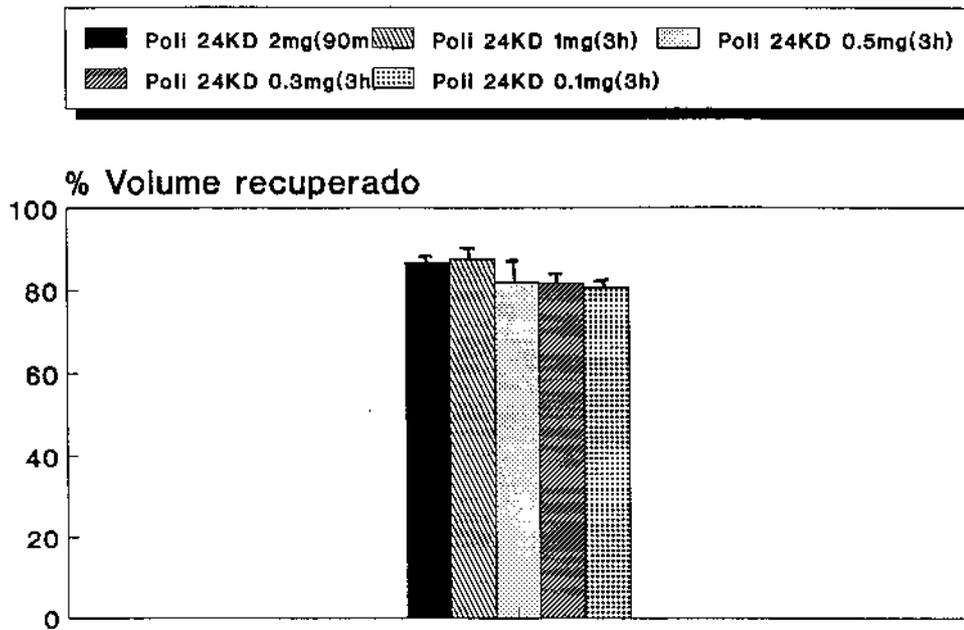


FIG VII- CURVA DOSE-RESPOSTA NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 24KD (100, 300, 500, 1000 e 2000ug/1ml/IT), salina 1ml/IT. (n = 5 para cada grupo). A porcentagem do volume recuperado foi avaliada em 90 minutos para poli. 2mg, e em 3 e 24 horas para as demais doses.

FIG VII-C

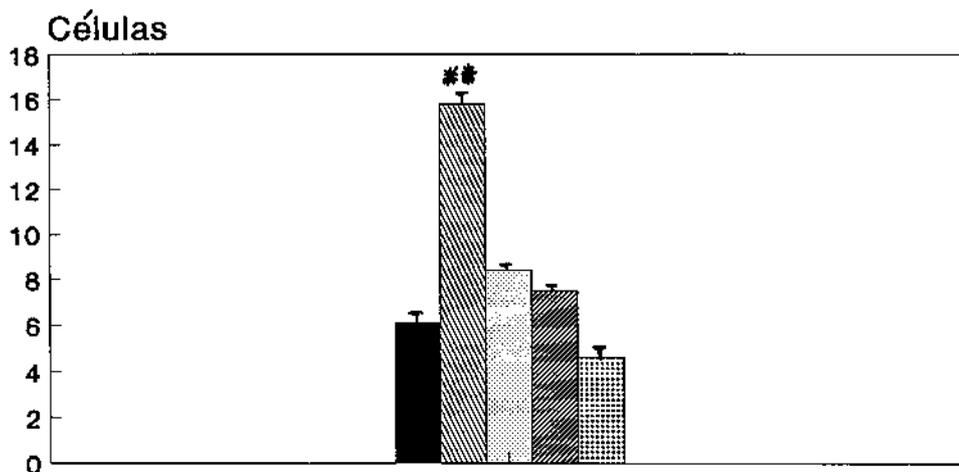
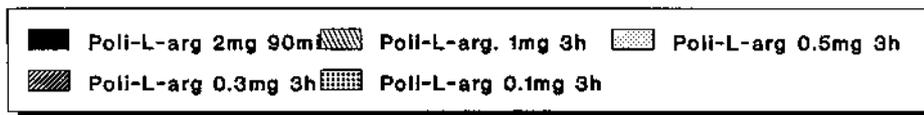


FIG VII- CURVA DOSE-RESPOSTA NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 24KD (100, 300, 500, 1000 e 2000ug/1ml/TT), salina 1ml/TT. (n = 5 para cada grupo). A celularidade no LBA foi avaliada em 90 minutos para poli. 2mg, e em 3 e 24 horas para as demais doses. A celularidade foi expressa células totais x 10⁶. (**p < 0.01)

FIG VII-D

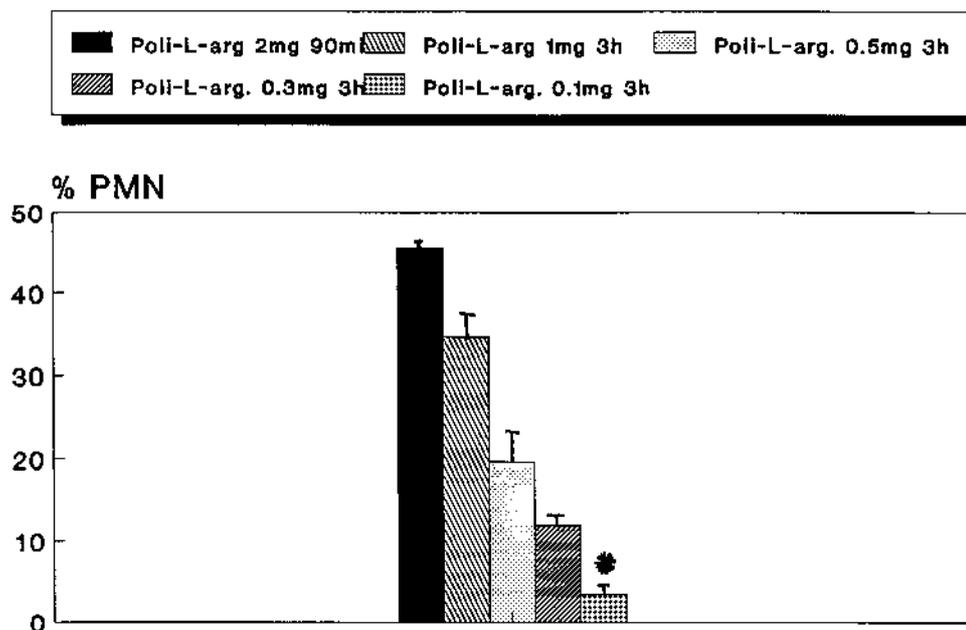


FIG VII- CURVA DOSE-RESPOSTA NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 24KD (100, 300, 500, 1000 e 2000ug/1ml/IT), salina 1ml/IT. (n = 5 para cada grupo). A porcentagem de PMN da celularidade do LBA foi avaliada em 90 min para a poli 2mg e em 3 horas para as demais doses. (* p < 0.05)

FIG VIII

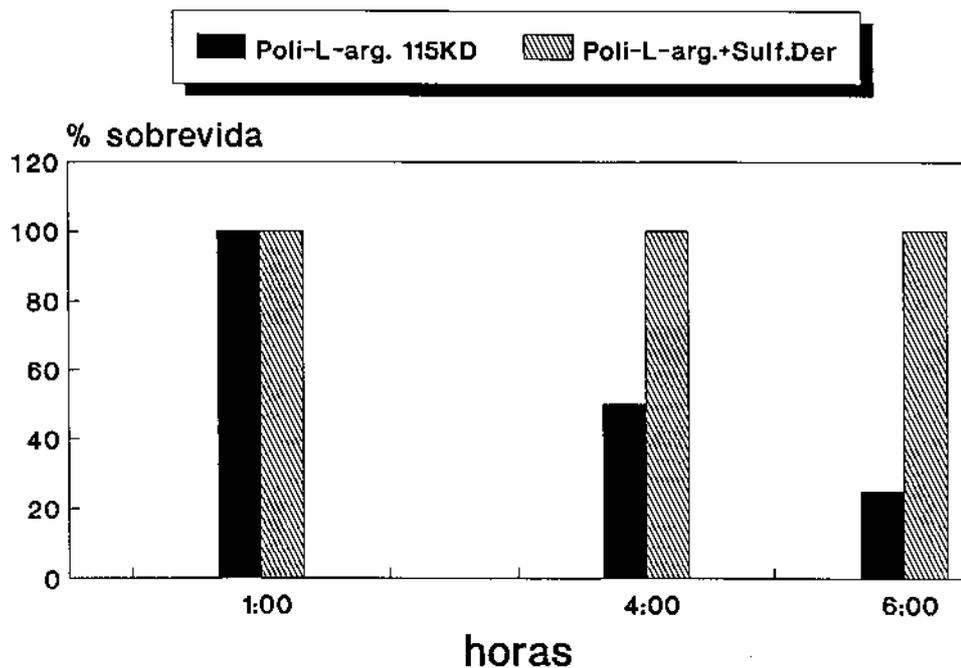


FIG VIII- EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DE CARGAS NO EDEMA PULMONAR INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA NA SOBREVIDA DOS ANIMAIS.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT, e poli-L-arginina 115 KD + sulfato de dermatam 1.mg (mistura em 1ml/IT). A sobrevivida foi avaliada 1, 4 e 6 horas apos a injeção IT.(n = 5 ou 6 para cada grupo)

FIG IX

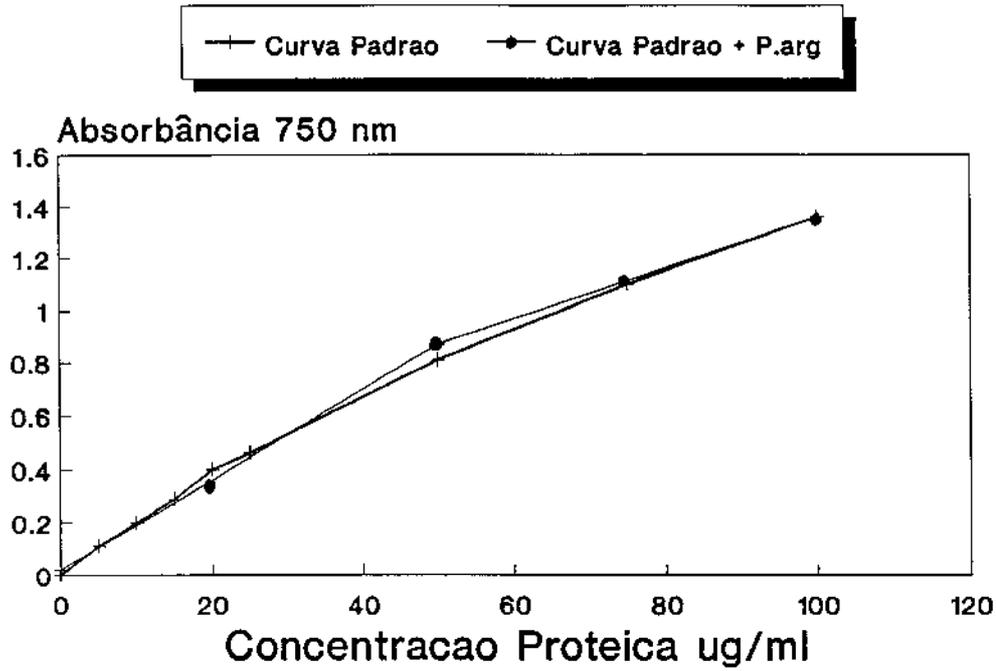


FIG IX- EFEITO DA POLI-L-ARGININA NA CURVA PADRÃO DE PROTEÍNA.

Poli-L-arginina 115KD 10ug adicionado aos seguintes pontos da curva padrão: 0, 50 e 100 ug de ovoalbumina bovina.

FIG X

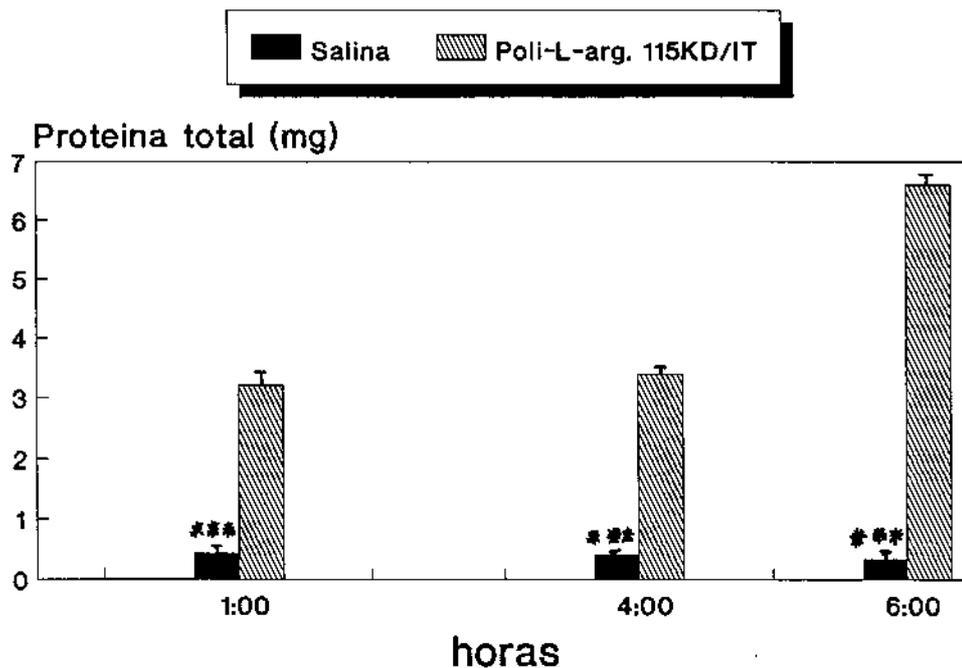


FIG X- CONCENTRAÇÃO PROTEICA NO LBA APÓS INDUÇÃO DO EDEMA DE PUMÃO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-l-arginina 115KD 1mg/1ml/IT, salina 1ml/IT. Experimento 1, 4 e 6 horas apos. Poliarginina 1h: n = 5,4h:n = 3, 6h:n = 2; salina 1h:n = 5, 4h:n = 4, 6h:n = 5.

FIG XI

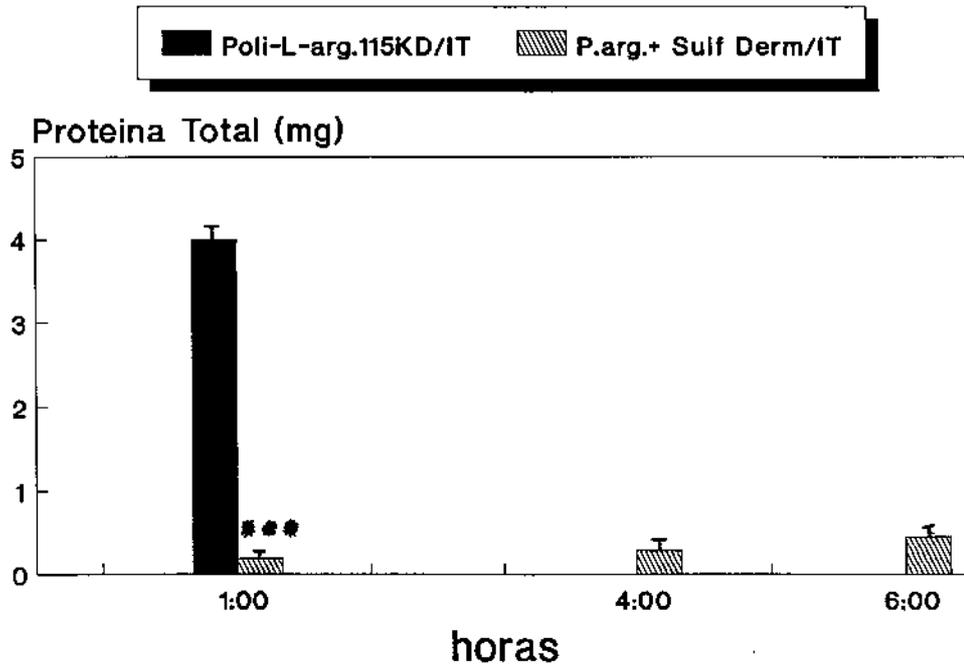


FIG XI- EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DE CARGAS NA CONCENTRAÇÃO PROTEICA NO LBA APÓS INDUÇÃO DO EDEMA DE PULMÃO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT, e poli-L-arginina 115KD 1mg + sulfato de dermatam 1.mg/ volume total 1ml/IT. Experimento realizado 1, 4 e 6 horas após. Poliarginina 1h: n = 6; poliarginina + sulfato de Dermatam 1h: n = 6, 4h:n = 6, 6h:n = 5. (** p < 0.01)

FIG XIII

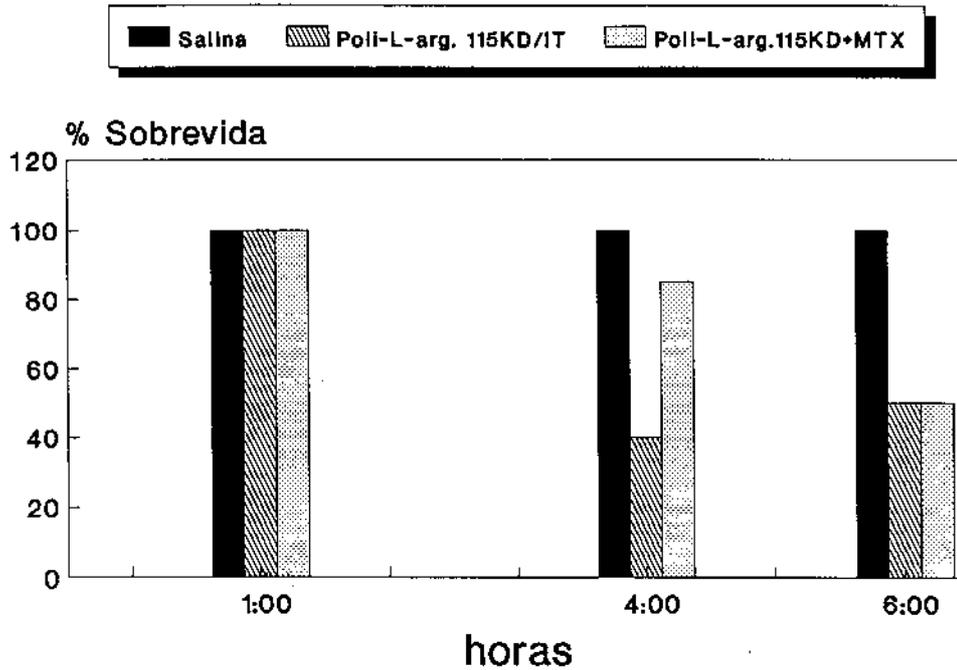


FIG XII- EFEITO DO METOTREXATO NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT, e poliarginina em grupos tratados com metotrexato, salina 1ml/IT. A sobrevida foi avaliada 1, 4 e 6 horas após. (Poliarginina 1h: n = 5, 4h: n = 5, 6h: n = 6; poliarginina + metotrexato e salina cada grupo com n = 5)

FIG XII-B

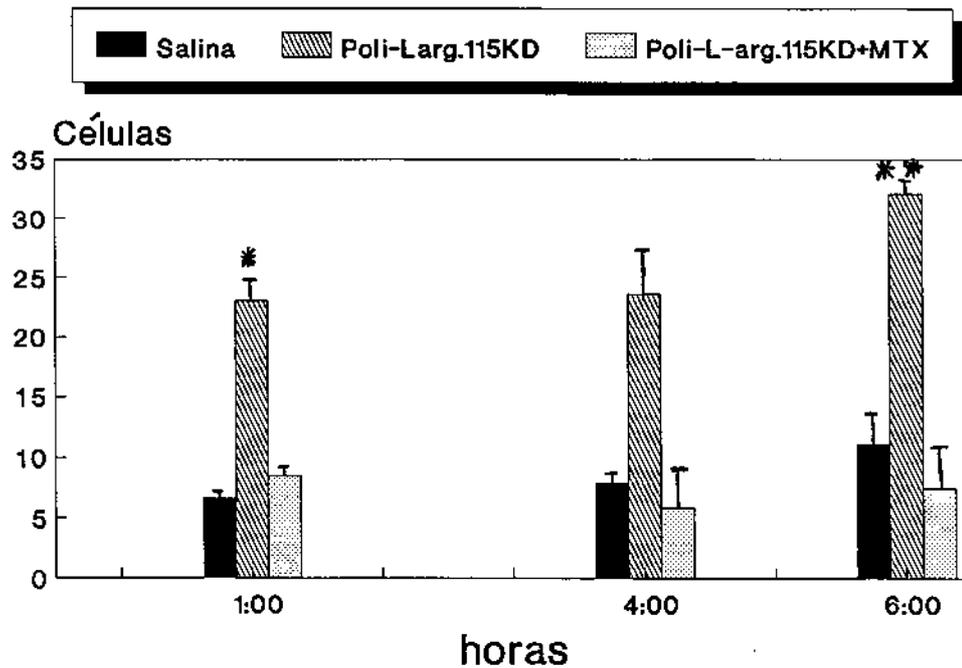


FIG XII- EFEITO DO METOTREXATO NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/TT, e poliarginina em grupos tratados com metotrexato, salina 1ml/TT. A celularidade foi avaliada 1, 4 e 6 horas após. A celularidade foi expressa como células totais $\times 10^6$. (Poliarginina 1h: n=5, 4h: n=5, 6h: n=6; poliarginina + metotrexato e salina cada grupo com n=5) (** p < 0.05).

IV-3-12 Depleção de Histamina e 5-HT

O edema de pulmão foi induzido com poli-L-arginina 24KD (1mg/IT) em animais controle e tratados com o composto 48/80. O experimento foi conduzido 1 e 6 horas após a injeção intratraqueal. Os animais depletados de histamina e 5-HT não apresentaram diferença significativa quanto ao volume recuperado ou quanto a sobrevida Fig.XIII-A, porém a migração celular para o espaço alveolar foi reduzida na 1ª e 6ª hora, Fig. XIII-B.

O edema de pulmão foi induzido pelo composto 48/80 (10ug/IT)

em animais controle e tratados previamente com o composto 48/80. Os animais tratados apresentaram redução da migração celular na 1ª hora do experimento. Não houve diferença significativa na quantidade de volume recuperado e a sobrevida foi de 100% no grupo tratado e controle. Fig XIII-A,B.

IV-3-13 Eicosanóides

O edema de pulmão foi induzido com poli-L-arginina 115KD (1mg/IT), e salina (1ml/IT), como controle. O experimento foi conduzido 1, 4 e 6 horas após. A figXIV-A mostra que a concentração de TXB₂ total do LBA nos animais tratados com poli-L-arginina está significativamente diminuída na 1ª hora do experimento, apresentando uma elevação na 4ª hora. Os níveis de 6oxo-PGF_{1α} permaneceram sempre baixos para ambos grupos, não havendo diferença significativa entre eles. FigXIV-B.

Não houve diferença significativa nos níveis de TXB₂ total, em ng, do LBA de animais injetados com poli-L-arginina 115KD (1mg/IT) (4.6 ± 1.2 ; n = 6) e a mistura poli-L-arginina 115KD (1mg) + sulfato de dermatam (1.5mg) IT (7.6 ± 1.7 ; n = 5) na 1ª hora. Nas horas seguintes apenas os níveis de TXB₂ dos animais tratados foi verificado (4h: 4.1 ± 0.7 ; n = 6; 6h: 6.4 ± 2.0 ; n = 5). Fig. XV.

IV-3-14 Histologia Pulmonar

A Fig.XVI-A,B mostra um pulmão controle, após 4 horas de injetado com 1ml de salina IT, em aumento 400X, e pulmão tratado com poli-L-arginina 115KD (1mg/1ml/IT), aumento 400X. O pulmão que recebeu poliarginina apresenta grande quantidade de hemáceas e líquido no espaço alveolar, observando-se também infiltração discreta de PMN.

A injeção IT de poliarginina em outras espécies como o camundongo, cobaia e coelho determinou lesões semelhantes as observadas no rato. Como mostram as Fig.XVII. A e B a infiltração leucocitária nas lesões induzidas no coelho foi significativamente maior quando comparadas as observadas nas outras espécies estudadas.

A histologia do pulmão de um rato que casualmente sobreviveu por sete dias mostrou reação caracterizada por proliferação fibroblástica focal e aumento da celularidade intersticial (Fig. XVIII). Observa-se também, ausência de infiltrado de PMN restando reduzido número de macrófagos intralveolares (FigXVIII-C).

FIG XIII-A

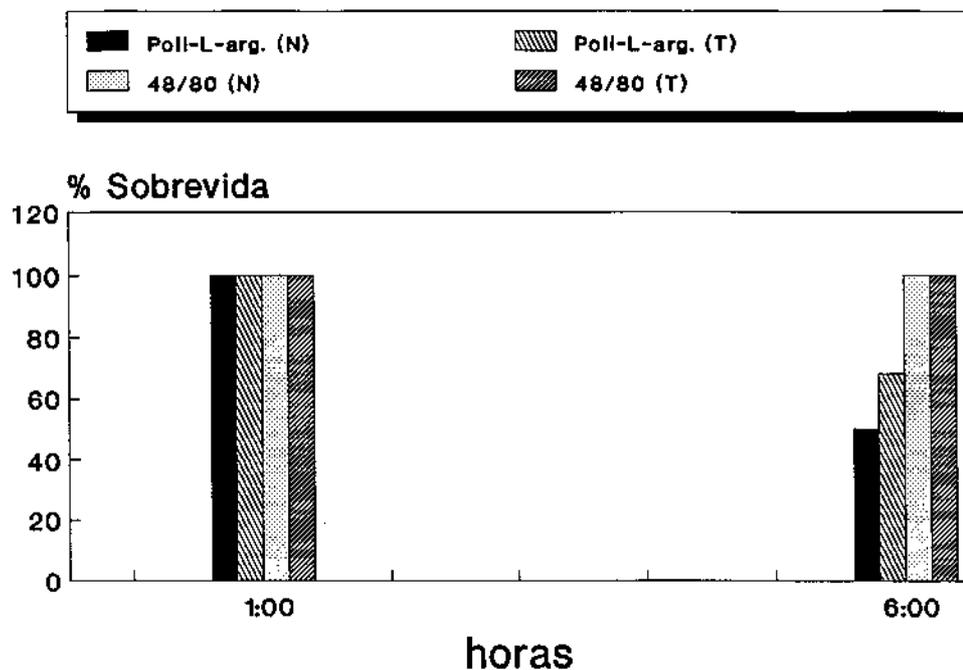


FIG XIII- EFEITO DA DEPLEÇÃO DE HISTAMINA E 5-HT NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 24KD 1mg/1ml/TT em animais normais e animais tratados com (T) o composto 48/80. Composto 48/80 10ug/1ml/TT em N e T. A sobrevida foi avaliada 1 e 6 horas após. (Poliarginina 1h: n=4, 6h: n=6, poliarginina + tratamento 1h: n=4, 6h: n=5. Composto 48/80 1h: n=3, 6h: n=4. Composto 48/80 + tratamento 1h: n=4 e 6h: n=4) (**p < 0.01)

FIG XIII-B

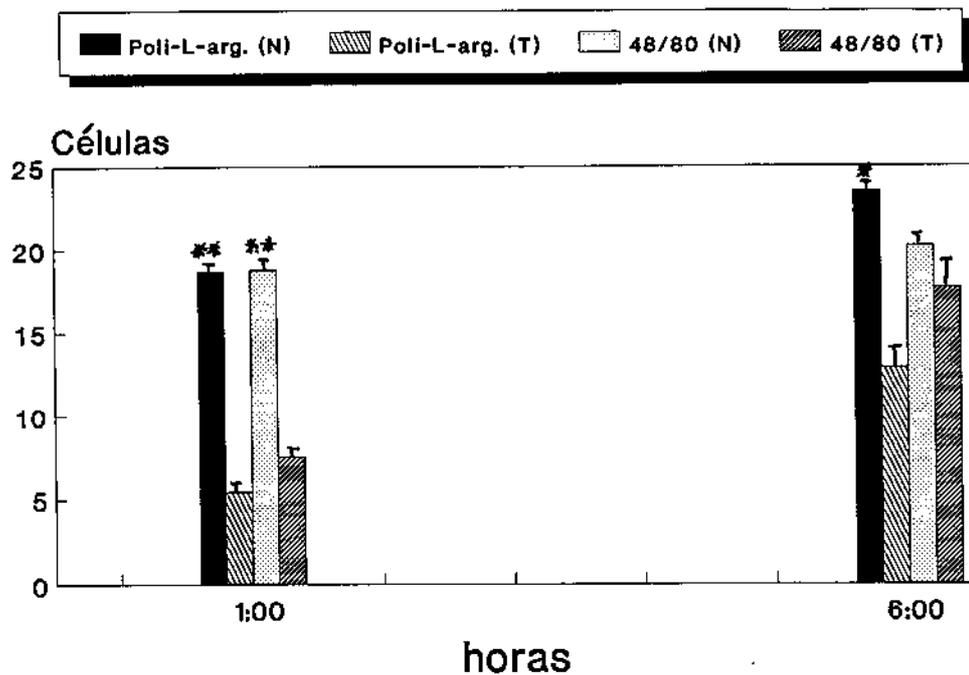


FIG XIII- EFEITO DA DEPLEÇÃO DE HISTAMINA E 5-HT NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 24KD 1mg/1ml/IT em animais normais e animais tratados com (T) o composto 48/80. Composto 48/80 10ug/1ml/IT em N e T. A celularidade foi expressa como células totais $\times 10^6$. Experimento realizado em 1 e 6 horas apos. (Poliarginina 1h: n=4, 6h: n=6, poliarginina + tratamento 1h: n=4, 6h: n=5. Composto 48/80 1h: n=3, 6h: n=4. Composto 48/80 + tratamento 1h: n=4 e 6h: n=4). (**p < 0.01)

FIG XIV-A

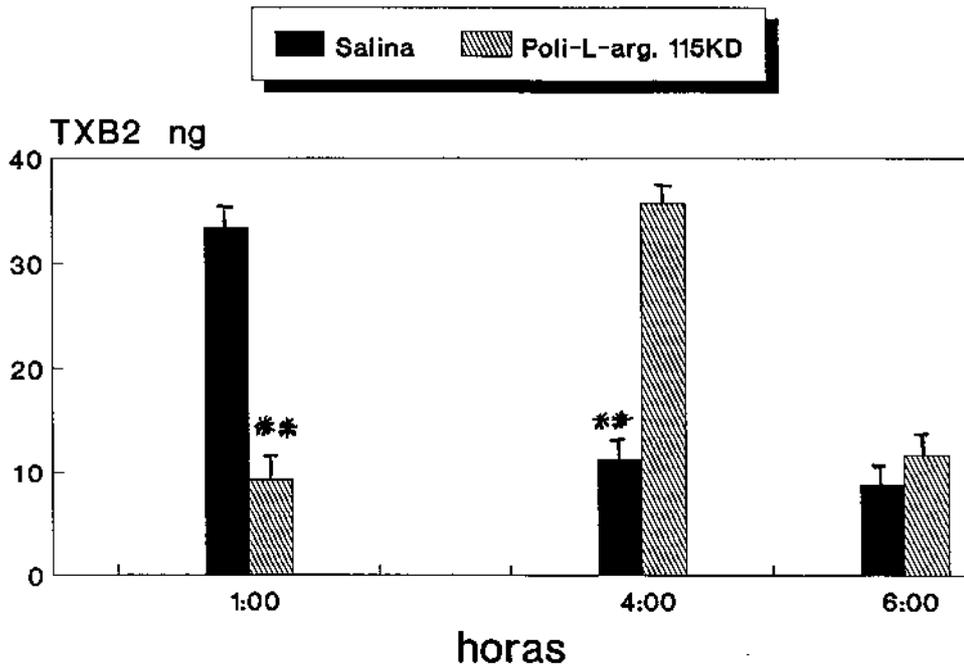


FIG XIV- NÍVEIS DE TXB₂ NO LBA DO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT, e salina 1ml/IT. TXB₂ total em ng, mensurado 1, 4 e 6 horas após. (Poliarginina 1h: n = 5, 4h: n = 4, 6h: n = 2. Salina 1h: n = 5, 4h: n = 4, 6h: n = 5). ** p < 0.01.

FIG XIV-B

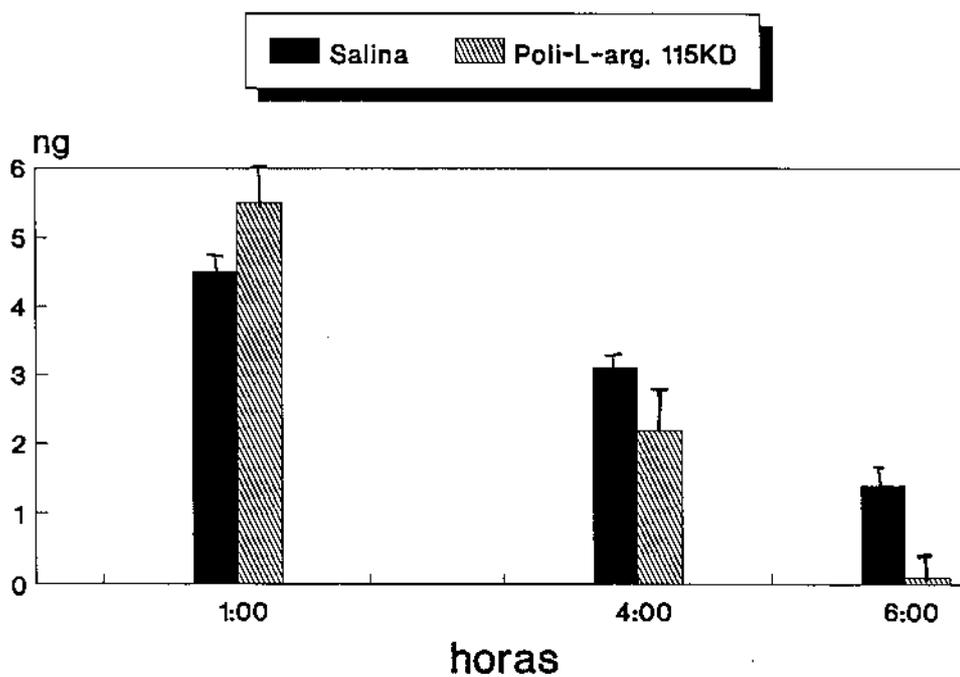


FIG XIV- NÍVEIS DE 6-OXO-PGF_{1-α} NO LBA DO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/TT, e salina 1ml/TT. 6-OXO-PGF_{1-α}- total em ng, mensurado 1, 4 e 6 horas após. (Poliarginina 1h: n=5, 4h: n=4, 6h:n=2. Salina 1h:n=5, 4h:n=4, 6h:n=5). ** p < 0.01.

FIG XV

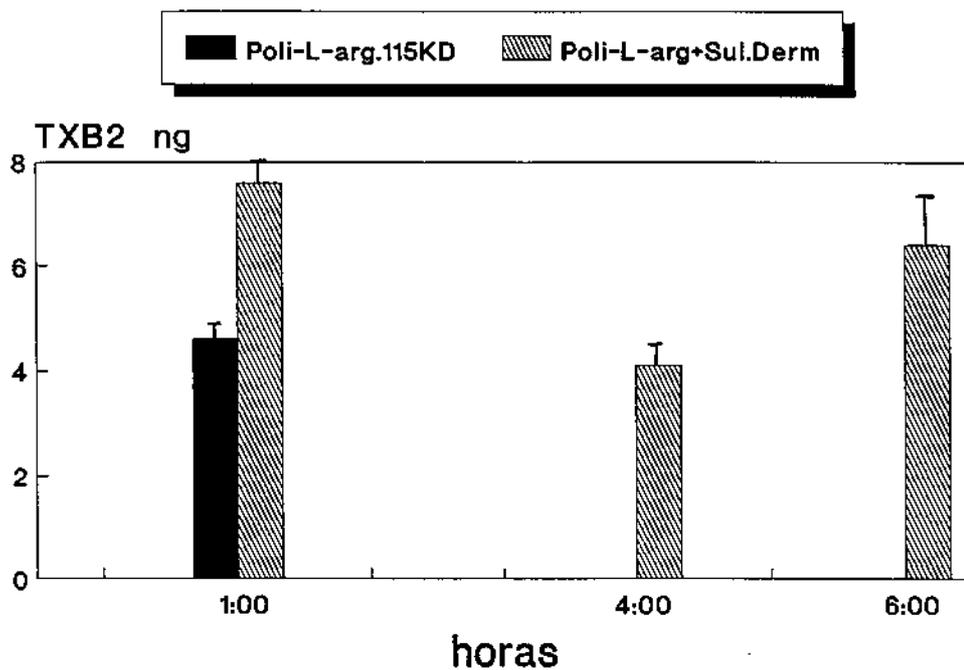


FIG XV- EFEITO DA NEUTRALIZAÇÃO DE CARGAS NOS NÍVEIS DE TXB₂ NO LBA DO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA. Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT, poli-L-arginina 115KD 1mg + sulfato de dermatam 1.5mg/ volume total de 1ml/IT. Poliarginina 1h: n=6. Mistura 1h:n=5, 4h: n=6, 6h: n=5.

FIG XVI- ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POPLI-L-ARGININA EM RATOS.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/IT. Experimento 4 horas após. A- Salina aumento 400X. B-Poliarginina, aumento 400X. Mostrando intenso acúmulo de material eosinofílico intralveolar. C- poliarginina aumento 1600X. mostrando marginalização leucocitária e acúmulo de eritrócitos e material eosinofílico extravascular.

FIG XVII- ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA NO COELHO.

Poli-L-arginina 24KD 4mg/kg/TT, solução 1mg/ml. Mostrando acúmulo de material eosinofílico intralveolar e intenso infiltrado predominantemente neutrofílico. (A: aumento 400X; B: aumento 1600X).

FIG XVIII- ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO EDEMA DE PULMÃO INDUZIDO PELA POLI-L-ARGININA EM RATOS, EFEITO TARDIO.

Poli-L-arginina 115KD 1mg/1ml/TT. Experimento em 7 dias. A- Notam-se lesões inflamatórias focais e alveolos distendidos e rompidos.(aumento 400X). B- Detalhe da figura anterior mostrando infiltrado inflamatório mononuclear e proliferação fibroblástica (aumento 1600X). C- Alvéolos com presença de material eosinofílico rendilhado e macrófago alveolar "espumoso" (aumento 1600X). Nota-se ausência de PMN em A,B, e C.

IV-4 Conclusões e Discussão

A introdução de polications via traqueal resultou em taquipnéia duradoura e a presença de líquido espumoso e sanguinolento na narina dos animais. Esses sinais precediam a morte dos animais, e optou-se pelo sacrifício dos animais antes da instalação do quadro clínico completo, na tentativa de evitar o sofrimento dos animais. A mortalidade aumentou com o tempo sendo máxima após a 6ª hora da injeção IT de poliarginina.

A introdução de poliarginina intratraqueal em ratos, levou a uma leucopenia precoce (1ª hora) em sangue periférico, acompanhado da presença de aprisionamento de leucócitos em pulmão, segundo os achados em histologia pulmonar. A presença de leucócitos principalmente do tipo PMN no LBA reforça o conceito de que a queda dessa célula no sangue periférico é devida ao seu sequestro no pulmão, como pode acontecer em outros modelos de SARA em animais (Stephens *et al.*, 1988)

A migração celular para o espaço alveolar se deu principalmente as custas de PMN, apresentando um aumento tempo e dose-dependente com a administração de poliarginina IT. O PMN foi implicado como principal agente desencadeador da SARA em humanos e animais, baseado nos achados de histologia nessas situações (Esbensahde *et al.*, 1979).

Atualmente acredita-se que o leucócito não seja o agente desencadeador, mas que seja atraído para o pulmão pela ação das quimiocinas produzidas por macrófagos e C5, pois pacientes leucopênicos e animais depletados de PMN continuam a apresentar a SARA. O modelo de edema de pulmão induzido por polications também não mostrou ser dependente do PMN uma vez que animais depletados de PMN apresentaram a mesma mortalidade encontrada nos animais não depletados de PMN.

A presença de polications no espaço aéreo desencadeou um edema pulmonar, mantido durante todo o experimento. A diminuição do índice pulmonar sêco-úmido na administração de poliarginina intratraqueal e o aumento na celularidade observada no LBA foi acompanhado da presença de líquido e migração de PMN no espaço alveolar como observado a histologia.

A depleção de histamina e 5-HT nos animais apenas reduziu a migração celular, sem reduzir a mortalidade. Torna-se difícil a explicação para a redução de células no LBA no edema de pulmão induzido pela poliarginina frente a depleção de histamina e 5-HT uma vez que o pulmão de rato não apresenta mastócitos em sua constituição.

A quantidade de proteínas no LBA aumentou dramaticamente no grupo de animais que receberam poliarginina intratraqueal, e foi máxima na sexta hora do experimento. A principal barreira para a passagem de proteínas para o alvéolo e o epitélio pulmonar ((Brigham *et al.*, 1974). A neutralização das cargas das polications, foi o único fator que diminuiu a mortalidade dos animais. A perda da configuração aniônica no interstício e superfície da barreira alvéolo-capilar foi fator fundamental na determinação da mortalidade do edema de pulmão induzido por polications.

É descrito níveis aumentados de TXB₂ e 6 oxoPGF_{1α} durante a SARA, e algumas das anomalias encontradas nessa síndrome atribuí-se a esses mediadores. Os níveis de TXB₂ foram reduzidos no edema de pulmão induzido pela poliarginina, porém mantiveram-se baixos com a utilização da mistura de poliânions e polications.

A introdução de polications na pata (Antunes *et al.*, 1990), na derme e no peritônio (Stein *et al.*, 1956), na pleura e na via endovenosa (Capítulo III) não levaram os animais a

morte. A instilação intratraqueal de mesma dose de polications levou os animais a alta mortalidade. A injeção de polications intravenosa não levou a um maior aumento na migração celular para o espaço alveolar. Isto indica que é necessário a neutralização de cargas da superfície epitelial (ou membrana basal abaixo dela) para haver edema pulmonar. É descrito que substâncias catiônicas são indutoras do edema de pulmão e hipertensão pulmonar, e que estes efeitos podem ser neutralizados com substâncias aniônicas (Chang *et al.*, 1987; Fairman *et al.*, 1987). A mortalidade dos animais após induzido o edema de pulmão com polications intratraqueal apenas foi drasticamente abolida após a administração de agentes aniônicos.

A indução da SARA através dos polications oferece um novo modelo para o estudo da fisiopatologia e terapêutica dessa síndrome.

Capítulo V

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

A poliarginina e polilisina induziram a pleurisia em ratos.

A poliarginina e polilisina induziram edema de pulmão em ratos quando administradas intratraqueal.

V-1 Efeito no Sangue

A poli-L-lisina *in vitro* inibe a formação de trombina e a aglutinação e destruição dos eritrócitos. Esses efeitos ocorrem *in vivo* apenas quando empregados em doses letais (80mg/kg). A utilização de polímeros ácidos heparina e ácido poli-l-aspártico antagoniza o distúrbio hemolítico e de coagulação (De Vries *et al.*, 1953).

A administração de poli-L-arginina por diferentes vias mostrou resultados distintos. Através da via endovenosa levou a uma leucocitose periférica precoce, Capítulo III, provavelmente devido ao aumento do hematócrito, como se acontecer na administração de sulfato de protamina (Fairman *et al.*, 1987). A introdução intrapleural não diferiu do controle com salina na indução da leucocitose tardia. Provavelmente os polications chegam a circulação com suas cargas neutralizadas. A via intratraqueal levou a uma leucopenia precoce, devido ao aprisionamento de PMN no tecido pulmonar, visto a histologia pulmonar, Capítulo IV.

Assim como o pulmão a pleura oferece uma grande superfície para a interação e neutralização dos polications.

V-2- Pleurisia

Polications induziram a pleurisia sem levar a morte dos animais, Capítulo III. A pleurisia foi tempo e dose dependente para a migração celular e dose dependente para o volume de exsudato produzido. Não houve dependência com a carga molecular utilizada da poliarginina. Os PMN influenciaram no processo inflamatório induzido por polications, porém não foram agentes capazes de inibir a inflamação, como observado com a utilização de substâncias aniônicas.

Prostaglandinas não desempenharam papel importante na evolução da pleurisia induzida por polications, como observado nos níveis de TXB₂ e 6oxoPGF_{1-α} do exsudato pleural. A utilização de bloqueador da cicloxigenase, indometacina, não alterou a evolução do processo inflamatório pleural.

A pleura possivelmente apresenta sítios aniônicos em sua superfície, como ocorre com os microdomínios na superfície endotelial dos capilares.

V-3 Edema de Pulmão

De Vries (1953) utilizou polilisina (15mg/kg/iv) em ratos e observou morte dos animais dentro de 12 minutos. O exame histológico pulmonar revelou edema perivascular e acúmulo de fluido no interior do alvéolo. A mortalidade dos animais foi abolida com a utilização de

histamina. A administração de sulfato de protamina por via endovenosa leva a hipertensão pulmonar revertidos com a utilização de compostos aniônicos como a heparina e albumina (Chang *et al.*, 1987; Fairman *et al.*, 1987).

A administração de poliarginina (3mg/kg) em ratos não levou os animais a morte quando injetado intraplantar (Antunes *et al.*, 1999), intrapleura ou intravenoso (Capítulo III). A mesma dose intratraqueal causou uma mortalidade de 70% na sexta hora. Houve uma migração de PMN tempo e carga dependente, cujo ápice culminou com a mortalidade dos animais, porém a hipótese de que o PMN seja responsável pela síndrome foi descartada através da observação da mortalidade dos animais previamente depletados de PMN. Animais depletados de PMN apresentaram a mesma mortalidade que o grupo que recebeu apenas poliarginina intratraqueal.

Animais depletados de histamina e serotonina não apresentam redução da mortalidade.

Prostaglandinas não desempenham um papel fundamental na indução do edema de pulmão.

A utilização de agentes aniônicos reduziu drasticamente o extravazamento de proteínas do capilar pulmonar para o alvéolo, reduzindo para zero a mortalidade dos animais.

V-4 Polications

Provavelmente a superfície pleural e alveolar apresentem sítios aniônicos em sua superfície, formando uma barreira para a passagem de proteínas em seu interior. Os polications na superfície pleural estimulariam os mastócitos pleurais a liberarem histamina e amplificarem o processo. A depleção de histamina e serotonina reduziu a resposta inflamatória observada na pleurisia. Na superfície alveolar do rato não há mastócitos, sendo de localização predominantemente tissular, e neste local a histamina provavelmente não atue como um agente amplificador do processo.

Mastócitos pulmonares humanos apresentam uma capacidade de liberar histamina diferente dos mastócitos das superfícies serosas de ratos na presença de polications (Holgate *et al.*, 1982). A neutralização de sítios aniônicos em pulmão por substâncias catiônicas liberadas por bactérias ou por células durante o processo inflamatório pulmonar poderia ser o início da SARA. A utilização de compostos aniônicos no tratamento da SARA abriria uma nova perspectiva terapêutica no tratamento dessa patologia.

Summary

Summary

The surface of endothelial cells is covered by negatively charged microdomains. The presence of cationic substances, for example polycations, in contact with rat skin, peritoneum and paw initiates an inflammatory process characterized by the infiltration of leukocytes and an increase in local permeability.

In this work, the effect of polycations (poly-L-arginine and poly-L-lysine) was studied in two surfaces with distinct physiological and morphological characteristics: the pleura and the alveolus. For this purpose, a model of pleurisy and a model utilizing the intratracheal administration of polycations were used.

Polycations were capable of inducing pleurisy and pulmonary edema. The intratracheal administration of these compounds, in the same dose used via the pleural route, resulted in a high mortality. The inflammatory response to these compounds depends on the site of application. Histamine and 5-HT depletion reduced the volume of exudate produced in animals subjected to pleurisy, but did not reduce the mortality in animals which received polycations intratracheally.

Neutralization of the polycation charge, through the use of anionic compounds (heparin and dermatan sulfate) markedly reduced the volume of pleural exudate and completely abolished the lethal effect of polycations administered intratracheally.

These results suggest that the pleural and alveolar surfaces possess negatively charged microdomains which may be neutralized during the inflammatory process. This hypothesis suggests that anionic compounds may offer a new therapeutic approach to the treatment of inflammation.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Alexander, I.G. (1968). The ultrastructure of the pulmonary alveolar vessel in Mendelson's (acid pulmonary aspiration) syndrome. *Br. J. Anaesth.* 40:408-432.
- Agostoni, E. (1972). Mechanics of the pleural space. *Physiol. Rev.* 52:57-128.
- Antunes, E., Mariano, M., Cirino, G., Levi, S. & de Nucci, G. (1990). Pharmacological characterization of the polycation-induced rat hind-paw oedema. *Br. J. Pharmacol.*, in press.
- Ashbaugh, D.G., Bigelow, F., Petty, T.L. & Levine, B.E. (1967). Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2:319-323.
- Bakhle, Y.S. (1982). Decrease inactivation of prostaglandin E2 in isolated lungs from rats with alfa-naphthyl thiourea-induced oedema. *Biochemic. Pharmac.* 31:3395-3401.
- Barnes, J.L., Radnik, R.A., Gilchrist, E.P. & Venkatachalam, M.A. (1984). Size and charge selective permeability defects induced in glomerular basement membrane by a polycation. *Kidney* 25:11-19.
- Beal, F.A., & Dalldorf, F.G. (1966) The pathogenesis of the lethal effects of anthrax toxin in the rat. *J. Infect Dis* 116:377-387.
- Bernard, R.G., Lucht, W.D., Niedermeyer, M.E., Snapper, J.R., Ogletree, M.L. & Brigham, K.L. (1984) Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J. Clin Invest.* 73:1772-1784.
- Bernard, G.R. & Brigham, K.L. (1986). Pulmonary edema. Pathophysiologic mechanisms and new approaches to therapy. *Chest* 89:594-600.
- Brenner, B.M., T.H., Hoestetter, H. & Humes, H.D. (1978). Glomerular permeability barrier based on discrimination of molecular size and charge. *Am. J. Physiol.* 235:F455-F460.

- Brigham, K.L., Woolverton, W.R., Blake, L.H., Staub, N.C. (1974). Increased sheep lung vascular permeability caused by pseudomonas bacteremia. *J. Clin. Invest.* 54:792-804.
- Brigham, K.L. & Owen, P.J. (1975). Increased sheep lung vascular permeability caused by histamine. *Cir. Res.* 37:647-657.
- Brigham, K.L. & Meyrick, B. (1986). Endotoxin and lung injury. *Am. Rev. Resp. Dis.* 133:913-927.
- Borg, T., Alvfors, A. Gerdin, B. & Modig, J. (1985). A porcine model of early adult respiratory distress syndrome induced by endotoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 29:814-830.
- Camussi, G., Tetta, C., Mazzuco, G., Monga, G., Roffinello, C., Alberton, M., Dellabona, P., Malavasi, F. & Vercelloni, A. (1986). Platelet cationic proteins are present in glomeruli of lupus nephritis patients. *Kidney Int.* 30:555-565.
- Chang, S.W., Wescott, J.Y., Henson, J.E. & Voekel, N.F. (1987). Pulmonary vascular injury by polycation in perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.* 67:1932-1943.
- Chinard, E.P., Enns, T. & Nolan, M.F. (1962). The permeability characteristics of the alveolar capillary bed. *Tras. Assoc. Am. Phys.* 75:253-261.
- Coonors, A.F., MacCaffree, D.R. & Rogers, M.R. (1981). The adult respiratory distress syndrome. *D.M.* XXVII:1-75.
- Cooray, G.H. (1949). Defensive mechanisms in the mediastinum with special reference to the mechanics of pleural absorption. *J. Pathol. Bacteriol.* 61:551-567.
- Cotrell, T.S., Levine, O.R., Senior, R.M., Weiner, J., Spiro, D. & Fishman, A.P. (1967). Electron microscopy alterations of the alveolar level in pulmonary edema. *Circ. Res.* 21:783-791.
- Craddock, P.R., Fehr, J., Brigham, K.L., Kronenberg, R.S. & Jacob, H.S. (1977). Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyser cellophane membranes. *J. Clin. Invest.* 59:879-888.

- Danon, D.L., Goldstein, L., Marikovsky, Y. & Skultelsky, E. (1972). Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. *J. Ultrastruct. Res.* 38:500-510.
- De Vries, A., Feldman, J.D., Stein, O. & Katchalsky, A. (1953). Effects of intravenously administered poly-D-lysine in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 82:237-240.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P. & Willoughby, D.A. (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Path.* 104:15-29.
- Edwards, J.C.W., Sedgwick, A.D., and Willoughby, D.A. (1981). The formation of a structure with the features of sinovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. *J. Path.* 134:147-152.
- Esbensahde, A.M., Newman, J.H., Lams, P.M., Jolles, H. & Brigham, K.L. (1979). Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep. Lung mechanics and lung balance. *J. Appl. Physiol.* 53:967-976.
- Fairman, R.P., Sessler, C.N., Bierman, M. & Glauser, F.L. (1987). Protamine sulfate causes pulmonary hypertension and edema in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 62:1363-1367.
- Fisher, P., Glauser, F.L., Millen, J.E., Lewis, J. & Egan, P. (1977). The effect of ethchlorvynol on pulmonary alveolar membrane permeability. *Am. Rev. Res. Dis.* 116:901-906.
- Finegold, M.J. (1967) Interstitial pulmonary edema. An electron microscopy study of the pathology of staphylococcal enterotoxaemia in rhesus monkey. *Lab. Invest* 16:912-923.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)* 288:373-376.
- Gad, F.A., Silver, R.I. & Futan, G.D. (1982). Polycation-induced fusion of negatively charged vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* 690:124-132.
- Gee, M.H., Staub, N.C. (1977). Role of bulk fluid flow in protein permeability of the dog lung alveolar membrane. *J. mAppl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 42:144-149.

- Guccione, M.A., Packmam, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Perry, D.W. & Mustard, J.F. (1986). Reaction of polylysine with human platelets in plasma and in suspension of washed platelets. *Thrombos. Haesmostas.* 36:360-375.
- Hanahoe, T.H.P. & Jones, D.R. (1988). Heparin and acute inflammation in the rat. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immun.* 86:243-244.
- Hansen-Flashen, J. & Fishman, A.P. (1988) Adult respiratory distress syndrome: Clinical feature and pathogenesis. In "Pulmonary Disease and Disorders". MacGraw-Hill Book Company. Vol 3:2201-2213.
- Harris, P. & Health, D. (1986). The interstitial space of the lung. In the human pulmonary circulation. Churchill Livingstone 359-372.
- Hayes, J.A. & Shiga, A. (1970). Ultrastructural changes in pulmonary oedema produced experimentally with ammonium sulphate. *J. Path.* 100:281-286.
- Higgs, G.A., Bunting, S., Moncada, S. & Vane, J.R. (1976). Polymorphonuclear leucocyte produce thromboxane A₂-like activity during phagocytosis. *Prostaglandins* 12:749-757.
- Hiebert, L.M. (1981). The uptake of heparin by liver sinusoidal cells in normal and atherosclerotic rabbits. *Thromb. Res.* 21:383-390.
- Holgate, S.T. & Church, M.K. (1982). Control of mediators release from mast cells. *Clin Alerg. (England)* 12:5-13.
- Ignarro, L.J., Gold, M.E., Buga, G.M., Burns, R.E., Wood, K.S., Chaudhuri, G. & Frank, G. (1989). Basic polyamino acids rich in arginine lysine or ornithine cause both enhancement of refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Cir. Res.* 64:315-329.
- Jenkins, C.S.P., Pacman, M.A., Kislough-Rathbone. & Mustard, J.F. (1971). Interaction of polylysine with platelets. *Blood* 37:395-412.

- Landis, E.M., Pappenheimer, J.R. (1963). Exchange of substances through the capillary walls. In Handbook of physiology Circulation. Section 2. Volume II. Washington DC: Am. Physiol. Soc. 961-1034.
- Larsen, G.L., MacCarthy, K., Webster, R.D., Henson, J.E. & Henson, P.M. (1980). A differential effect of C5a and C5a-des-arg in the induction of pulmonary inflammation. Am. J. Pathol 100:179-192.
- Lewis, G.P. (1963). Pharmacological actions of bradykinin and its role in physiological and pathological reaction. Ann N.Y. Acad. Sci. 104:236-247.
- Light, R.W. (1983) Anatomy of the pleura. In pleural diseases. Phyladelphia, 1-6.
- Lin, W.L. (1988). Leakege of blood retinal barrier due to damaging effect of protamine sulfate on the endothelium. Act Neuropathol. 76:427-431.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Rabdall, A.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Kasmierowski, J.A., Gallin, J.I. & Reynold, H.Y. (1978) Mechanisms for the inflammatory response in primate lungs: Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage derived chemotatic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 59:273-281.
- Katchalsky, A., Danon, D., Nevo, A. & De Vries, A. (1959). Interaction of basic polyeletrolites with the red blood cell. II Agglutination of red blood cells by polymeric bases. Biocchim. Biophys. 33:120-132.
- Kazimierczak, W. & Diamond, B. (1978). Mechanisms of histamine release in anaphylatic and anaphylactoid reaction. Prog. Allergy 24:295-365.
- Kish, B. (1965) Electron microscopy of capilay hemorrhage. I. Post hypoxemia hemorrhage in the lungs. Expl. Med. Surg. 23:117-123.
- Kuhn, C. (1968). Cytochemistry of pulmonary alveolar epithelial cells. Am. J. Pathol. 53:809-813.

- Krown, S.E., Kerr, D. & Stewart, W.E. (1985). Phase I trial of poly (IC) complex in advanced cancer. *J. Biol. response Modif. (USA)* 4:640-649.
- Majno, G., Shea, S.M. & Leventhal, M. (1969). Endothelial contraction induced by histamine-type mediators. An electron microscopy study. *J. Cell. Biol.* 42:647.
- Marinovsky, Y., Inbar, M., Danon, D. & Sachs, L. (1974). Distribution of surface charge and concavalin-A binding sites on normal and malignant transformed cells. *Exp. Cell. Res.* 89:359.
- Needham, L., Hellewel, P.G., Willams, T.J. & Gordon, J.L. (1988). Endothelial functional responses and increased vascular permeability induced by polycations. *Lab. Invest.* 59:538-548.
- Odberg, H. & Olsson, I. (1975). Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *J. Clin. Invest.* 56:1118-1124.
- Olsson, I. & Vengue, P. (1974). Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic proteins of the granules of leukemic myeloid cells. *Blood* 42:235-246.
- Parker, J.C.S., Gilchrist, S. & Cartledge, J.T. (1985). Plasmalymph exchange and interstitial distribution volumes of charged macromolecules in the lung. *J. Appl. Physiol.* 59:1128-1136.
- Pietra, G.G., Sampson, P., Lankester, P.N., Hansen-Flashen, J., Fishman, A.P. (1983). Transcapillary movement of cationized ferritin in the isolated perfused rat lung. *Lab. Invest.* 49:54-61.
- Pietra, G.G. (1984). Biology of diseases: New insights into mechanisms of pulmonary edema. *Lab. Invest.* 51:489-494.
- Plummer, M.J. & Stone, R.S. (1964). The pathogenesis of viral influenzal pneumonia in mice. *Am. J. Path* 45:95-104.
- Pugliese, F., Singh, A.K., Kasinath, S.B., Kreisberg, J.I. & Lewis, E.J. (1987). Glomerular epithelial cell, polyanion neutralization is associated with enhanced prostanoïd production. *Kidney Inter.* 32:57-61.

- Reidboard, H.E. & Spitz, W.U. (1966). Ultrastructural alterations in rat lungs. Changes after intratracheal perfusion with freshwater and seawater. *Arch. Path.* 81:123-111.
- Renkin, E.M. (1964) Transport of large molecules across capillary walls. *Physiolgist* 7:13-28.
- Richter, C.P.(1945) The developement and use of alpha-naphtyl thiourea (ANTU) as a rat poison. *JAMA*, 129:927-931.
- Rowley, D.A. & Benditt, E.P. (1953) 5-HT and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents wich damage mast cells in rats. *J. Exp. Med.* 103:399-412.
- Rubini, J.R., Becker, R.R. & Stahmann, M.A. (1953). Effect of synthetic lysine polypeptides on rabbits blood coagulation. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 82: 237-240.
- Salmon, J.A. (1978) A radioimmunoassay for 6-keto-prostaglandin F1-alfa. *Prostaglandins* 15:383-397.
- Samuelson, B., Boegeal, P., Hammarstron, S. & Murph, R.C. (1979). *Prostaglandins* 17:785-&87.
- Sawyer, P.N., Srinivasan, S. (1972). The role of electrochemical surface properties in thrombosis at vascular interfaces: Cumulative experience of studies in animal and man. *Bull. N.Y. Med.* 48:235-242.
- Schiffman, E., Corcoran, B.A. & Wahl, S. (1975). N-phoemilmethionil peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:1059-1062.
- Schneenberg, E.E., Karnovisky, M.J. (1976). Substructure of intercelular junction in freeze fractures of alveolar capillary membranes of mouse lung. *Circ. Res.* 38:404-411.
- Scully, M.F., Kakkar, V.V. & Ellis, V. (1986). Localization of heparin in mast cells. *The Lancet* 27:718-719.
- Shier, W.T., Dubourdieu, D.J. & Dunkin, J.P. (1984). Polycations as prostaglandin synthesis inducer: Stimulation of arachidonic acid release and prostaglandins synthesis in cultured fibroblast by poli(1-lysine) and others synthetic polycations. *Biochim. Biophys.* 793:238-250.

- Shier, W.T. & Dubourdieu, D.J. (1986). Polycations as prostaglandins synthesis inducers . II Structure-activity relationships. *Prostaglandins* 31:1145-1159.
- Simionescu, N., Simionescu, M. & Palade, G.E. (1975). Permeability of muscle capillaries to small heme-peptide. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. of Cell. Biol.* 64:586-607.
- Simionescu, M., Simionescu, N., Silbert, J.E. & Palade, G.E. (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II Partial characterization of their anionic sites. *J. Cell. Biol.* 90:614-621.
- Skultelsky, E., Rudich, Z. & Danon, D. (1975). Surface charge properties of the luminal front of blood vessel wall: an electron microscopical analysis. *Thromb. Res.* 7:623-634.
- Skultelsky, E., Danon, D. (1976). Redistribution of surface anionic site on the luminal front of blood vessel endothelium after interaction with polycationic ligand. *J. Cell. Biol.* 71:232.
- Spector, W.G. (1956) The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J. Path. Bact* 72:363-380.
- Stein, O., De Vries, A. & Katchalsky, E. (1956). The effect of polyaminoacids on the blood vessels of the rats. *J. Path. Bact.* 72:367-380.
- Stephens, K.E., Ishizaka, A., Larrick, J.W. & Raffin, T.A. (1988). Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. *Am Rev. Resp. Dis.* 137:1364-1370.
- Stone, C.A. & Loew, C.R. (1949). effect of various drugs on epinephrine-induced pulmonary edema in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71:122-126.
- Subjeck, R.T. & Weiss, T. (1975) The binding of cationized ferritin at the surface of Eherlich ascites tumor cells The effect of pH and glutaraldehyde fixation . *J. Cell. Physiol.* 85:529-535.
- Taylor, A.E., Gaor, K.A.Jr. (1970). Stimulation of equivalent pore radii of pulmonary capillary and alveolar membranes. *Am. J. Physiol.* 218:1133-1142.

- Thomas, G., Mostaghin, R. & Ramwell, P.W. (1986). Endothelial dependent vascular relaxation by arginine contained peptides. *Biochem. Bioph. Reser. Comm.* 141:446-451.
- Vaccaro, C.A. & Brodi, J.S. (1981). Structural features of alveolar wall basement membrane in the adult rat lung. *J. Cell. Biol.* 91:427-437.
- Zeya, H.I. & Spitznagel, K.J. (1966). Antimicrobial specificity of leucocyte lysosomal cationic proteins. *Science* 154:1049-1051.
- Waiseman, E. & Chang, V. (1969). The role of fibrin in the inflammatory response to carrageenan. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 159:206-210.
- Wang, N.S. (1974). The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *Am Rev. Resp. Dis.* 110:623-633.
- Wedmore, W.C. & Willams, T.J. (1981). Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289:646-650.
- Weibel, E.R. (1973). Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol Rev* 53:419-495.
- Weibel, E.R., Gehr, P., Haies, D., Gil, J., Bachofen, H. (1976). The cell population of the normal lung. In: Bouhuys A., ed. *Lung cells in disease*. Amsterdam: North-Holland 3-16.
- Willams, T.J. & Jose, P.J. (1981). mediators of increased vascular permeability after complement activation histamine-independent action of rabbit C5A. *J. Exp. Med.* 153:136-153.
- Willis, A.L. (1969). Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion. *J. Pharmac.* 21:126-128.
- Willoughby, D.A. & Giroud, J.P. (1969) The role of polymorphonuclear leukocytes in acute inflammation in agranulocytic rats. *J. Path.* 98:53-67.
- Wilhelm, D.L. (1962). The mediation of increased vascular permeability in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 14:251-264.

- Winter, C.A., Risley, E.A. & Nuss, G.W. (1962). Carrageenan-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111:544-547.



SCAN - Editoração Eletrônica - Fone: (0192) 31-7173