

DORIS APARECIDA ANTONIO DE SOUZA MARTINS ^{t 366}
FARMACÊUTICA

INFLUÊNCIA DA belametasona, piroxicam E
diclofenaco potássico SOBRE A LEUCODIAPÉDESE.
ESTUDO *in vivo*,
EM CAMUNDONGOS.

Orientador: Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE ^t

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
DOUTOR em Ciências - Área de Farmacologia

PIRACICABA - SP

1994

Aos meus pais Rubens e Valéria,

pelo constante incentivo e apoio para que pudesse seguir o meu caminho nesta vida.

Ao meu esposo Tomaz,

pela paciência e cooperação em todos os momentos compartilhados.

Aos meus filhos Felipe e Henrique,

que me ensinaram o sentido da vida.

A toda a minha família,

sem a qual eu nada seria.

Dedico com amor este trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade

Pela orientação firme e objetiva. Pela confiança e exemplo de profissionalismo. Serei sempre grata pela amizade e dedicação a mim dirigidas.

O meu respeito e admiração.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VOGT, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo constante trabalho em prol da qualidade do ensino e da pesquisa.

Ao Prof. Dr. RENATO ROBERTO BIRAL, Diretor da FOP/UNICAMP, pela dedicação em todas as suas atribuições.

Ao Prof. Dr. MATHIAS VITTI, Digníssimo Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação de Odontologia de Piracicaba pela atenção e apoio.

À Prof. Dra. MARIA DE LOURDES GARBOGGINI DA GAMA, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação - Área de Farmacologia, da FOP - UNICAMP, pela dedicação para com os alunos.

Aos DOCENTES DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA, que se dedicam com seriedade e afinco na formação dos alunos de Pós-Graduação.

Aos FUNCIONÁRIOS DA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNICAMP, em especial a SRA. VALÉRIA DUARTE DE SOUZA, ASSISTENTE TÉCNICA DE DIREÇÃO, pela extrema eficiência e atenção com que sempre receberam os alunos de Pós-Graduação.

À Sra. ANA MARIA COSSA DE ARRUDA SILVEIRA, Secretária da Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela amizade e consideração sempre demonstradas.

À Sra. SUELI APARECIDA DE OLIVEIRA SOLIANI, Bibliotecária da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo auxílio na revisão bibliográfica desta tese.

Ao Sr. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, Técnico da Área de Farmacologia, pela colaboração na realização da parte experimental deste trabalho.

Às Sras. VILMA BIZUTI DOS SANTOS e MARIA ELIZA DOS SANTOS pela amizade e carinho dispensados.

Ao colega FRANCISCO CARLOS GROppo, pelos serviços de digitação deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo apoio a esta pesquisa, através da concessão de bolsa de estudo.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	PÁGINA
1 - INTRODUÇÃO	02
2 - REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 - O PAPEL DO NEUTRÓFILO NA INFLAMAÇÃO	05
2.2 - CORTICOSTERÓIDES E A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	08
2.3 - ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES (AINES) E A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	12
3 - PROPOSIÇÃO	17
4 - MATERIAL E MÉTODOS	19
5 - RESULTADOS	23
6 - DISCUSSÃO	28
7 - CONCLUSÃO	34
RESUMO	36
SUMMARY	38
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
APÊNDICE	47

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

De acordo com vários fatores, ligados aos estímulos injuriantes ou ao hospedeiro, a inflamação pode ser didaticamente classificada em aguda (imediate) ou crônica (contínua). A resposta inflamatória aguda tem uma duração relativamente curta (minutos, horas ou poucos dias), sendo caracterizada por fenômenos como a dilatação e o aumento da permeabilidade da microvasculatura local, levando à hiperemia e formação de exsudato. Destaca-se também, nesta fase inicial, a intensa participação dos leucócitos, especialmente dos neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares neutrofilicos ou simplesmente PMNs).

Nos dias atuais, parece existir o consenso de que a resposta inflamatória pode ser encarada como um processo de defesa do organismo. Entretanto, ressalta-se que alguns eventos da inflamação, considerados como "protetores", de acordo com a intensidade podem se transformar em fenômenos destrutivos, aumentando ainda mais a lesão tecidual (LENGFELDER, 1984).

Dentre estes eventos inflamatórios, destaca-se a formação de edema (WEDMORE & WILLIAMS, 1981), a fagocitose e conseqüente liberação de potentes enzimas lisossomais, bem como a produção de radicais oxigenados tóxicos livres (KLEBANOFF, 1980; HARLAN et al, 1981; WEISS et al, 1981; PALMBLAD, 1984), todos eles ligados, pelo menos em parte, às funções do neutrófilo, a principal célula efetora da inflamação aguda.

De fato, WEDMORE & WILLIAMS (1981), após uma série de experimentos em coelhos, concluíram que os neutrófilos são essenciais para que ocorra o aumento da permeabilidade vascular, induzido por substâncias quimiotáticas (Leucotrieno B₄ e fração C5a do sistema complemento).

Por outro lado, PALMBLAD (1984), entre outros autores já citados, demonstraram que os neutrófilos constituem-se em ativos mediadores da injúria tecidual, através da liberação de constituintes de seus grânulos e pela geração de radicais oxigenados tóxicos (O₂⁻, H₂O₂ e OH⁻).

Uma vez aceita esta importante participação dos PMNs na resposta inflamatória aguda, é válido argumentar que os fármacos que diminuem a cinética dos neutrófilos, ou que atenuam a liberação de substâncias biologicamente ativas por estas células apresentem, como conseqüência, uma ação antiinflamatória.

Dentre estes, destacam-se os antiinflamatórios esteróides, ou simplesmente corticosteróides, pela sua potência de ação. De acordo com DI ROSA et al (1985), os corticosteróides exibem múltiplos mecanismos de ação antiinflamatória, de forma indireta, através da indução da síntese de proteínas efetoras, como as lipocortinas, vasocortinas e cininase II / ACE.

Apesar da complexidade destes mecanismos, que serão melhor discutidos no decorrer deste trabalho, pode-se acrescentar ainda as palavras de

CLAMAN (1983), que diz textualmente: "a redução do acúmulo e agregação de neutrófilos e monócitos macrófagos no sítio inflamatório, pode representar o maior mecanismo antiinflamatório dos corticosteróides". Este conceito encontra suporte, pelo menos em parte, em vários trabalhos experimentais que demonstraram a propriedade dos corticosteróides em diminuir a migração leucocitária para os focos inflamados (FRUHMANN, 1964; VINEGAR et al, 1972; PERPER et al, 1974; THIEME et al, 1982; ANDRADE, 1991).

Além dos corticosteróides, uma outra grande família de medicamentos tem sido amplamente empregada, com o objetivo de prevenir ou atenuar os eventos da inflamação. Estes são os antiinflamatórios não-esteróides ou não-hormonais, denominados genericamente no Brasil por AINES ou DAINES.

VANE (1971), demonstrou pela primeira vez que a "aspirina" e similares (AINES) inibiam a síntese de prostaglandinas, sugerindo que este seria então o principal mecanismo de ação antiinflamatória destes medicamentos. Inúmeros trabalhos laboratoriais se seguiram, ratificando o conceito de VANE e, além disto, sugerindo outros sítios de ação para estes fármacos.

ABRAMSON et al (1984), propuseram-se a determinar se os antiinflamatórios não-esteróides exerciam efeitos na ativação de neutrófilos, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, em humanos. Estudaram a agregação de neutrófilos, a geração de anions superóxidos e a liberação de enzimas lisossomais, demonstrando que os AINES podem inibir estas respostas dos neutrófilos, sendo o grau de inibição variável de droga para droga. Acrescentaram ainda que estas ações seriam independentes da inibição da síntese de prostaglandinas.

Sem dúvida, a etiopatogenia do processo inflamatório e o seu controle terapêutico, constituem-se numa das áreas de pesquisa mais investigadas em todo o mundo, com cada equipe procurando trazer informações relativas ao assunto, esclarecendo-se certas dúvidas ou, muitas vezes, tornando-o ainda mais complexo e controvertido.

Dentro deste contexto, o presente trabalho pretende também oferecer alguma contribuição, no que diz respeito aos mecanismos de ação de drogas com propriedades antiinflamatórias, através de um ensaio laboratorial "in vivo", em camundongos.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O PAPEL DO NEUTRÓFILO NA INFLAMAÇÃO

A leucodiapedese é uma das principais características da resposta inflamatória, sendo caracterizada pela emigração de leucócitos de pequenos vasos sanguíneos e seu acúmulo nos tecidos injuriados e inflamados (DI ROSA, 1979).

De acordo com ROBBINS et al. (1986), os tipos de células presentes na resposta inflamatória variam com a idade da lesão e com a natureza do estímulo. Especificamente na inflamação aguda, os neutrófilos predominam nas primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídos por monócitos em 24 a 48 horas. Segundo estes autores, esta sequência pode ser explicada de diferentes maneiras:

- 1) os neutrófilos tem vida curta, desintegrando-se e desaparecendo após 24 a 48 horas, enquanto os monócitos podem sobreviver por períodos mais longos.
- 2) a migração dos monócitos é mantida muito depois da migração dos neutrófilos ter cessado.
- 3) os fatores quimiotáticos para neutrófilos e monócitos são ativados em diferentes períodos da resposta.

FERREIRA (1980), relaciona a predominância dos neutrófilos na resposta inflamatória aguda, pela sua maior velocidade de migração em relação aos monócitos.

Há algumas exceções a este padrão de exsudação celular. Segundo MAJNO (1982), na infecção aguda produzida por *Pseudomonas*, os neutrófilos predominam por 2 a 4 dias; nas infecções virais, os linfócitos podem ser as primeiras células a responder; em algumas reações de hipersensibilidade, os eosinófilos podem se constituir no principal tipo celular envolvido.

Segundo TROWBRIDGE & EMILING (1989), a ativação dos sistemas intracelulares do neutrófilo por mediadores químicos específicos possuem potenciais citotóxicos. A liberação de constituintes lisossomais e a geração de radicais oxigenados tóxicos são considerados os dois principais produtos intracelulares dos PMNs, podendo causar danos às células endoteliais.

De acordo com KLEBANOFF (1980), os neutrófilos são responsáveis pela produção de radicais oxigenados tóxicos (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) visando à destruição de microorganismos invasores e outras células estranhas. Entretanto, esse sistema tóxico de defesa pode ocasionalmente ser dirigido às células normais do hospedeiro.

Segundo BABIOR (1978), a ação bactericida do neutrófilo é dependente do metabolismo do oxigênio, através da produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila.

Em 1981, WEISS et al., demonstraram que os neutrófilos humanos podem destruir uma cultura de células endoteliais, através da formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

HARLAN et al. em 1981, num ensaio *in vitro* onde foram empregadas células endoteliais humanas e neutrófilos ativados por zymosan, concluíram que proteases neutras derivadas de neutrófilos controlam a separação de células endoteliais, através da digestão de proteínas da superfície celular endotelial, incluindo a fibrinectina.

Segundo WEDMORE & WILLIAMS em 1981, além da função de gerar radicais tóxicos com propriedades destrutivas, os neutrófilos também teriam um papel importante no controle da permeabilidade capilar e conseqüente formação de edema.

Da mesma forma, FANTONE et al. (1982) e PALMBLAD (1984), estão de acordo que a produção de radicais oxigenados tóxicos pelos neutrófilos podem causar danos a muitos tipos de estruturas, tendo como conseqüência o aumento da permeabilidade vascular e formação de edema.

ABRAMSON et al., em 1984, observaram que a lesão de membranas celulares e a degradação de ácido hialurônico pode resultar da liberação de produtos derivados do oxigênio celular, durante a atividade dos fagócitos polimorfonucleares.

O soro, os líquidos teciduais e as células alvo possuem mecanismos protetores antioxidantes que inativam os radicais oxigenados potencialmente tóxicos. Mas a eficácia desses mecanismos protetores vai depender do equilíbrio entre produção e inativação destas moléculas por células e tecidos (WARD et al., 1983).

Segundo ROBBINS et al. 1986, os neutrófilos contém grânulos lisossômicos (específicos e azurófilos), que quando liberados, podem contribuir para a resposta inflamatória. A infiltração leucocitária inicial, se não debelada, pode potencializar o aumento da permeabilidade vascular, da quimiotaxia e do dano tecidual.

Entretanto, da mesma forma que com os radicais oxigenados, essas proteases nocivas são controladas por um sistema de antiproteases no soro e nos líquidos teciduais, sendo necessário portanto um equilíbrio entre a produção e a inativação dessas enzimas, para o sucesso do processo (JANOFF et al., 1982).

Existe uma série de agentes quimiotáticos para leucócitos, tanto de origem endógena como de origem exógena, sendo que um dos mais importantes é o

leucotrieno B₄, um dos principais produtos do metabolismo do ácido araquidônico, via lipoxigenase.

Segundo TURNER et al. (1975) e VANE & FERREIRA (1979), o leucotrieno B₄ constitui-se um dos mais potentes estímulos de migração leucocitária no local da inflamação, fato confirmado por MALMSTEN et al. (1980), que estudaram os efeitos de vários metabólitos do ácido araquidônico na quimiotaxia de PMNs, em resposta ao peptídeo FLMP, na presença de inibidores da cicloxigenase e lipoxigenase (FORD-HUTCHINSON et al., 1980).

O leucotrieno B₄ parece também induzir a secreção de enzimas lisossomais dos neutrófilos (GOETZL & PICKETT, 1980), a agregação e aderência destas células ao endotélio vascular (PALMBLAD et al., 1981; HIGGS & MONCADA, 1985), como também geração de íons superóxidos (MOILANEN et al., 1988).

UTOH et al. (1988), estudando a influência do trauma cirúrgico sobre a função dos neutrófilos, em humanos, concluíram que os PMNs no período pós-operatório têm uma alta capacidade em produzir leucotrienos, inclusive o LTB₄. Paralelamente, baixos níveis de radicais superóxidos foram detectados no mesmo modelo de estudo. Acreditam que tal fato possa ser explicado em decorrência da maior proporção de neutrófilos imaturos, no pós-operatório imediato.

2.2. CORTICOSTERÓIDES E A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Os corticosteróides são responsáveis por diferentes ações e efeitos farmacológicos, destacando-se aqueles relacionados ao processo inflamatório. Segundo a grande maioria dos pesquisadores, a ação antiinflamatória dos corticosteróides pode ser atribuída à múltiplos mecanismos.

SCHAVER (1974) atribue aos corticóides a habilidade de conter a vasodilatação provocada por cininas vasoativas, como a histamina e bradicinina.

SUGIO & TSURUFUGI (1981) demonstraram, em ratos, que a supressão da exsudação plasmática conseguida através da administração de betametasona, nas doses de 0,03; 0,1 e 0,3 mg/Kg, não é acompanhada por alterações do conteúdo sanguíneo e parece não ser dependente de efeitos vasoconstritores.

CLAMAN (1983), acredita que os corticosteróides possam antagonizar o sistema das cininas plasmáticas (bradicinina, em especial), o qual possui papel significativo na modulação das respostas vasculares do processo inflamatório.

STOUGHTON (1969), já considerava que a vasoconstrição enérgica produzida pelos corticosteróides constituía-se num importante mecanismo de ação antiinflamatória, servindo inclusive como modelo de estudo para se avaliar a potência de compostos esteróides sintéticos.

Segundo JOHNSON et al. (1982), tal assertiva está suportada pela ação inibitória dos corticosteróides sobre a síntese de prostaglandinas pelos fibroblastos da pele, células sanguíneas e endotélio vascular, assim como pela modulação da resposta das células da musculatura vascular lisa aos agentes vasoconstritores.

CLAMAN (1983), responsável por um cuidadoso artigo de revisão dos mecanismos antiinflamatórios dos corticosteróides, também admite que os mesmos são possuidores de uma ação direta no sistema vascular, quando aplicados tópicamente ou administrados por via sistêmica. Segundo este autor, o extravasamento de células e fluidos do compartimento intravascular para tecidos circunvizinhos, é inibido por estes medicamentos, sendo este efeito conseqüente à ação vasoconstritora combinada à limitação do tráfico de leucócitos. Além disto, os corticosteróides aumentariam a integridade endotelial vascular e diminuiriam a permeabilidade capilar, reduzindo desta forma a marginalização e adesão de neutrófilos na fase inicial da inflamação. Ainda acrescenta que, possivelmente, o principal mecanismo de ação antiinflamatória dos corticosteróides seja a redução combinada do acúmulo de neutrófilos e monócitos macrófagos no sítio inflamatório.

Prova disto é que três décadas antes, FRUHMANN (1962), estudando a mobilização de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos, demonstrou que quando os animais eram tratados com corticosteróide, injetado intraperitonealmente, ocorria uma diminuição acentuada do acúmulo destas células, sugerindo um efeito direto da droga sobre a microcirculação sanguínea.

Trabalhos mais recentes foram acrescentando conhecimentos cada vez mais detalhados, sobre os mecanismos de ação antiinflamatória dos corticosteróides.

Um controle múltiplo da inflamação pelos corticosteróides foi proposto por Di ROSA et al. (1985). Reunindo os achados obtidos por sua equipe e pelas de outros pesquisadores (DANON & ASSOULINE, 1978; BLACKWELL et al., 1980; HIRATA et al., 1980; JOHNSON et al., 1982; PARENTE et al., 1984), estes autores sugeriram que o mecanismo de ação dos corticosteróides está centrado na formação de um complexo receptor-esteróide citoplasmático, que penetrando no núcleo de células-alvo, estimulam um RNA que induz a síntese de proteínas efetoras. Tais proteínas seriam as lipocortinas, que inibem a síntese da fosfolipase A e, conseqüentemente, dos principais metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), as vasocortinas (que modulam a resposta vascular) e peptídeos que aumentariam os níveis fisiológicos de cininase II (enzima conversora de angiotensina).

A combinação dos efeitos destas proteínas, segundo os pesquisadores, ocorre com o cortisol em níveis fisiológicos como também em doses supra-fisiológicas de corticosteróides sintéticos, podendo ajudar na formulação de uma hipótese aceitável para a compreensão do controle da resposta inflamatória por estes medicamentos.

Com relação aos efeitos dos corticosteróides sobre a migração leucocitária, aspecto de grande interesse a esta pesquisa, a literatura mostra que o número de neutrófilos circulantes no sangue é geralmente aumentado pela administração de corticosteróides em ratos (FRUHMANN, 1962), camundongos (THOMPSON & van FURTH, 1970) e humanos (BOGGS et al., 1964). Apesar do alto número de neutrófilos circulantes, a maioria dos experimentos têm demonstrado um menor acúmulo destas células em áreas inflamadas.

Uma redução marcante da migração celular após a implantação de esponjas plásticas não reabsorvíveis, em ratos, foi observada após doses moderadas (10 mg/Kg) de hidrocortisona (SAXENA, 1960).

ISHIKAWA et al. (1969) trabalharam com a hidrocortisona, prednisolona, triamcinolona e betametasona, concluindo que o efeito inibitório destas drogas sobre a

emigração de leucócitos varia de acordo com a potência das mesmas e com a dose empregada.

VINEGAR et al. (1972) empregaram a betametasona (0,2 mg/Kg, via intraperitoneal), obtendo uma diminuição de mais de 50% do número de neutrófilos que foram mobilizados na cavidade pleural de ratos injetados com caolim.

PERPER et al. (1974), usando neutrófilos marcados com Cr^{51} , obtiveram uma inibição substancial (61%) do acúmulo destas células em patas de ratos inflamadas pela carragenina, quando previamente tratados com a parametasona, na dose de 1mg/Kg, por via oral.

SHEA & MORSE (1978), documentaram a inibição da quimiotaxia de neutrófilos humanos, induzida pelos corticosteróides.

GOLDSTEIN et al. (1976) demonstraram a depressão da função dos neutrófilos, em humanos, após tratamento com corticosteróides.

THIEME et al. (1982), estudaram os efeitos *in vivo* e *in vitro* da dexametasona, sobre a migração de leucócitos em ratos, demonstrando a ocorrência da inibição da migração normal de células mononucleares e polimorfonucleares para a área inflamada. As doses de corticosteróide empregados neste experimento variaram de 0,03 a 0,3 mg/Kg.

ANDRADE (1985), através do método da janela na pele ("Skin Window"), em ratos, observou que a migração leucocitária à área inflamada era drasticamente reduzida, quando os animais eram previamente tratados com a betametasona, em duas doses de 0,05 mg/Kg, com intervalo de 3 horas.

TAYLOR & CLARKE (1986) demonstraram mais uma vez que os corticosteróides inibem a síntese de leucotrienos, dentre eles o LTB_4 , um dos mais potentes agentes quimiotáticos para leucócitos.

Segundo HIGGS & MONCADA (1985), a inibição *in vitro* dos leucotrienos pelos antiinflamatórios não esteróides, nem sempre é comprovada em estudos *in vivo*. De acordo ainda com estes autores, somente a BW755L e a dexametasona demonstraram inibir a produção de leucotrienos, *in vivo*.

FILEP (1988) reportou que a ação antiinflamatória dos corticosteróides pode ser devida, em grande parte, à capacidade destes medicamentos em diminuir a síntese de LTB_4 pelos leucócitos polimorfonucleares neutrofilicos.

MUNIAIN et al. (1988), argumenta que existe muita similaridade entre os ritmos circadianos do cortisol e dos neutrófilos circulantes. Ambos apresentam valores baixos à noite e altos valores no início do período da manhã. Segundo os

pesquisadores, não está determinado ainda se concentrações fisiológicas de cortisol podem inibir a quimiotaxia de neutrófilos.

VIEIRA et al. (1989) procederam a estudos hematológicos da série branca em 15 pacientes, submetidos à cirurgias buco-maxilo-faciais, tratados com 20 mg de dexametasona no pós-operatório imediato. Obtiveram um aumento do número total de leucócitos circulantes no sangue no período pós-operatório, sendo que a contagem diferencial destas células mostrou que os neutrófilos eram os responsáveis por tais alterações quantitativas, desde que o número das demais células brancas estava diminuído.

ANDRADE (1991), demonstrou que a betametasona, quando administrada na dose única de 0,1 mg/Kg, em camundongos, diminuía significativamente ($p < 0,05$) a emigração de leucócitos para a cavidade peritoneal, induzida artificialmente pela ovoalbumina.

2.3. ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES (AINES) E A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Dois bioquímicos suecos, SUNE BERGSTROM e BENGT I. SAMUELSSON e um inglês, JOHN R. VANE, ganharam o Prêmio Nobel de Medicina por suas pesquisas sobre as prostaglandinas. Merecido prêmio, aliás esperado, não apenas pelo valor das contribuições científicas dos laureados, mas também pelas dificuldades técnicas do estudo dessas substâncias.

VANE (1971), através de uma série de experimentos em pulmão de cobaias, demonstrou que muitos dos efeitos terapêuticos e colaterais da aspirina e drogas similares (antiinflamatórios não esteróides - AINES), eram devidos à inibição da síntese de prostaglandinas, acrescentando que os leucócitos se constituíam numa das principais fontes geradoras destes autacóides, em resposta à injúria das membranas celulares, ponto de partida da resposta inflamatória.

Entretanto, como já foi dito anteriormente, os leucócitos (especialmente os neutrófilos) são responsáveis pela liberação de outros produtos, pró-inflamatórios, como as enzimas lisossomais, radicais oxigenados tóxicos e os leucotrienos.

Em função disto, autores como Di ROSA et al. (1972), já procuraram estudar os efeitos de drogas antiinflamatórias não esteróides sobre a migração leucocitária, chegando as seguintes conclusões:

1. Os leucócitos polimorfonucleares são pobremente susceptíveis aos AINES, baseado no fato de que a indometacina não inibiu a emigração de leucócitos em joelhos de cães injetados com urato de sódio, um irritante que causa migração celular sustentada pelos polimorfonucleares.
2. Existe uma diferente susceptibilidade das células envolvidas na inflamação aguda aos AINES.
3. Os AINES são mais especificamente efetivos na prevenção da migração de mononucleares, células responsáveis pelos processos inflamatórios crônicos.

Dando sequência aos seus estudos, DI ROSA (1974), observou um efeito inibitório de alguns AINES sobre os níveis de prostaglandinas e emigração de leucócitos em exsudato pleural de ratos, induzido pela carragenina. As drogas em estudo diminuíram os níveis de prostaglandinas no exsudato inflamatório bem como previniram a emigração de leucócitos. Os leucócitos emigrados foram considerados, segundo o autor, como a maior fonte geradora de prostaglandinas dentro da área inflamada.

Inicialmente pensou-se que os AINES não tivessem ação na outra via metabólica do ácido araquidônico, mediada pela lipoxigenase, que leva à produção de leucotrienos e lipoxinas. De fato, MOILANEN et al. (1988) observaram que os AINES apenas em altas concentrações inibiam a síntese de LTB₄.

Entretanto, HOCHBERG (1989), baseado na evidência de que o leucotrieno B₄ se constitui num poderoso agente quimiotático para os leucócitos, sugeriu que a inibição de sua síntese pelos AINES poderia contribuir para a ação antiinflamatória dessas drogas.

IP et al. (1990) estudaram os efeitos dos AINES sobre a quimiotaxia dos neutrófilos *in vivo* e *in vitro*. De acordo com estes autores, os AINES não têm efeito sobre a resposta quimiotática de células maduras *in vitro*, mas suprimem a quimiotaxia quando administrados *in vivo* por tempo prolongado. Isso poderia ser explicado, segundo eles, por efeito dos AINES sobre a maturação celular antes da liberação destas para a circulação.

Após a migração dos leucócitos para a área lesada, ocorre a agregação dessas células e, como consequência, perturbações simultâneas em sua membrana celular através de substâncias sinalizadoras, permitindo a ativação de sistemas intracelulares. Estes, por sua vez, apresentam um potencial citotóxico, sendo que os mais conhecidos são aqueles formadores de radicais oxigenados e a liberação de constituintes lisossomais (HARLAN et al., 1981).

Segundo DORMANDY (1980), existe normalmente na circulação antiproteases que neutralizam as enzimas destrutivas liberadas, além de radicais que varrem os ânions superóxido. Entretanto, em condições inflamatórias crônicas, persiste a estimulação dos leucócitos polimorfonucleares, aumentando sobremaneira os potenciais citotóxicos, sobrepunhando assim os mecanismos de defesa do organismo.

Os AINES são capazes de modular a função de leucócitos polimorfonucleares (LACKIE, 1977; O'FLAHERTY et al., 1979; SMOLEN & WEISSMANN, 1980). As funções das células afetadas por essas drogas *in vitro* incluem liberação extracelular de enzimas lisossomais (DAVIES et al., 1984; PALMER & SALMON, 1985), quimiotaxia e motilidade espontânea (BROWN & COLLINS, 1978; SMITH & WALKER, 1980) e a produção de ânion superóxido (O₂⁻), um agente bactericida (FRIMAN et al., 1986; NEAL et al., 1987).

ABRAMSON et al. (1984) realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo*, para avaliar os efeitos dos AINES sobre as funções dos neutrófilos. Demonstraram que, *in vitro*, o ibuprofeno não afetou a liberação de enzimas lisossomais como a geração de radicais superóxidos. Ao contrário, o piroxicam inibiu ambos os fenômenos. Este

mesmo medicamento quando empregado em humanos, na dose de 20 mg/dia demonstrou os mesmos efeitos observados *in vitro*, além de reduzir também a agregação de polimorfonucleares.

Segundo estes autores, a maioria dos AINES parece inibir a função dos neutrófilos, sendo que o grau de inibição varia de droga para droga, de maneira dose dependente. Acrescentaram ainda que tais efeitos são independentes da ação sobre a síntese de prostaglandinas.

KAPLAN et al. (1984), obtiveram resultados semelhantes aos descritos no parágrafo anterior, quando empregaram o piroxicam em humanos, na dose terapêutica diária de 20 mg.

BIEMOND et al. (1986), também concluíram que a função dos neutrófilos de indivíduos tratados com piroxicam, em doses terapêuticas, é significativamente reduzida.

ABRAMSON & WEISSMANN (1989) investigaram o processo de ativação do neutrófilo em detalhes. É importante destacar-se alguns aspectos desse mecanismo, desde que são relevantes para o entendimento da ação dos AINES.

Quando um neutrófilo recebe um estímulo apropriado (complexos imunes, agentes quimiotáticos - FMLP, C5a, Concanavalina A, LTB₄, etc.) uma série de reações metabólicas se inicia com um aumento de cálcio intracelular e mobilização da proteína C-quinase na membrana. Em segundos, ocorre a liberação de produtos potencialmente tóxicos como os grânulos de proteases e os radicais oxigenados.

De acordo com HOCHBERG (1989), a agregação dos neutrófilos é o sinal desses eventos intracelulares, como o prelúdio da degranulação e liberação de enzimas destrutivas dos tecidos.

A ativação do neutrófilo envolve a interação de um agente ativador (FMLP, C5a, PMA, etc.) ao receptor na superfície celular. Essa interação não somente inicia uma série de processos metabólicos, que utilizam os lipídeos da membrana como substrato para formação de mediadores extracelulares, mas também engatilha o caminho de um segundo mensageiro intracelular, que inicia-se com o catabolismo do fosfatidil-inusitol bifosfato (PIP₂) seguido da ativação da proteína C-quinase e mobilização de cálcio. O que ocorre a seguir é a formação de superóxido, agregação de neutrófilo e degranulação. Em altas doses os AINES parecem interferir com o mecanismo de gatilho situado na membrana para a ativação do neutrófilo.

Para um melhor entendimento do que foi dito, observar a FIGURA 1.

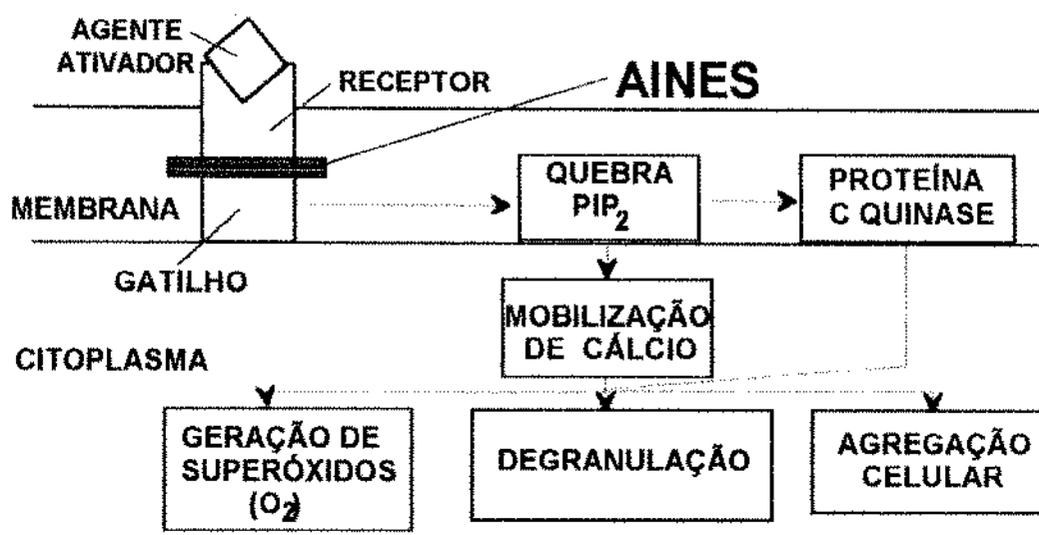


FIGURA 1 - Ativação do neutrófilo e o provável mecanismo de interferência dos AINES (HOCHBERG, 1989).

MINTA et al. (1985) compararam a capacidade dos AINES em modular a produção de O_2^- pelos PMN estimulados com dois tipos de agentes - FMLP (acetato de N-formil miristato) e PMA (acetato de formol miristato). Esses agentes são conhecidos por reagir com lugares distintos nos receptores localizados na membrana celular dos PMN. Dos AINES testados, o piroxicam foi um dos inibidores mais potentes na formação de O_2^- quando o agente usado foi o PMA. Já quando o FMLP foi empregado, o diclofenaco foi o inibidor mais potente na formação de O_2^- . Os autores concluíram que a ação inibitória dos AINES pode modular o processo de interação receptor-ligante.

PERIANIN et al. (1990), demonstraram que a estimulação de leucócitos polimorfonucleares potencia a recaptção do diclofenaco sódico e, como consequência, a inibição da quimiotáxia. Desta forma, formularam a hipótese de que este AINES se constitui num forte quimiotático negativo para a locomoção de leucócitos.

3 - PROPOSIÇÃO

3 - PROPOSIÇÃO

Em vista do importante papel dos leucócitos na resposta inflamatória, e da complexidade dos mecanismos de ação das drogas antiinflamatórias, propôs-se neste trabalho:

- Avaliar os efeitos de um corticosteróide (betametasona) e de dois antiinflamatórios não esteróides (piroxicam e diclofenaco potássico), sobre a leucodiapedese, *in vivo*, em camundongos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

1. SELEÇÃO DE ANIMAIS

Foram utilizados nesta pesquisa 40 camundongos SWISS adultos, machos, pesando 25+-2g , provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os mesmos foram alimentados com ração comercial (PRODUTAR®, ANDERSON CLAYTON S/A) e água à vontade.

2. GRUPOS DE ESTUDO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de estudo, cada um com 10 camundongos. Após a antissepsia da parede abdominal com isopropanol a 70%, os mesmos receberam os seguintes tratamentos, pela via intraperitoneal:

GRUPO I - solução salina (NaCl a 0,9%) num volume equivalente àqueles empregados nos demais grupos. Desta forma, constituiu-se no grupo CONTROLE.

GRUPO II - betametasona (CELESTONE® INJETÁVEL - Indústria Química e Farmacêutica Schering Plough Ltda), na dose única de 0,1mg/Kg de peso corporal.

GRUPO III - piroxicam (FELDENE® INJETÁVEL -Laboratórios Pfizer Ltda), na dose única de 0,5mg/Kg de peso corporal.

GRUPO IV - diclofenaco potássico (CATAFLAM® INJETÁVEL- Biogalênica Química e Farmacêutica Ltda.), na dose única de 2mg/Kg de peso corporal.

Exatamente 1 hora após os tratamentos acima descritos, de acordo com o grupo experimental, os animais receberam uma injeção de 0,1 ml de uma solução (10 mg/ml) de ovoalbumina (Albumin avs Eiern, Erg. B₆ Riedel - de Haën), via intraperitoneal, com o objetivo de estimular a emigração de leucócitos da corrente sanguínea para a cavidade peritoneal. Todos estes procedimentos foram realizados sob rigorosas condições de assepsia, prevenindo-se assim a contaminação da cavidade peritoneal dos animais em estudo.

Decorridas 5 horas da injeção de ovoalbumina, procedeu-se então ao sacrifício dos animais e colheita do fluído peritoneal, obedecendo-se aos seguintes passos técnicos, modificados em parte do modelo de estudo descrito por FRUHMANN (1964);

- a - Anestesia geral profunda, através da inalação de éter sulfúrico;
- b - Sacrifício dos animais, através da secção dos vasos sanguíneos do pescoço, deixando-se o sangue fluir naturalmente;
- c - Fixação dos animais à mesa operatória;
- d - Exposição cirúrgica da cavidade peritoneal, através de uma incisão linear da pele (região abdominal) e divulsão dos tecidos até a altura do externo. Neste ponto, procedeu-se a uma nova incisão, relaxante, permitindo o rebatimento da pele dos animais;
- e - Fixação, à mesa cirúrgica, da pele rebatida, de modo a formar uma bolsa com a parede peritoneal externa;
- f - Injeção intraperitoneal de um volume constante de 3 ml de uma solução de PBS (PHOSPHATE Buffered Saline) heparinizada, empregando-se para tal fim, uma seringa de 5ml e agulha hipodérmica de fino calibre (13x3,8mm);
- g - Massageamento delicado dos limites da cavidade peritoneal, pelo tempo de 10 segundos;
- h - Colheita do fluído peritoneal com uma seringa de plástico de 5 ml e agulha hipodérmica de grosso calibre (40x12mm). Para tal, introduziu-se a mesma na parte mais alta da cavidade peritoneal, em direção à bolsa formada até atingir-se o meio desta, evitando-se deste modo o contato da agulha com os tecidos da cavidade abdominal (intestinos, mesentério, epiplon, etc.). Aspirou-se cuidadosamente o fluído peritoneal, obedecendo-se sempre o volume padrão de 2 ml para cada animal;
- i - Deste volume, separou-se 0,9 ml em tubos de ensaio contendo 0,1 ml de solução de TURK, homogeneizando-se. O volume restante do material obtido foi desprezado.

Entre a colheita de material de um animal para outro, tomou-se o cuidado de lavar a agulha com água destilada (duas vezes), solução de PBS (duas vezes) e solução de PBS/heparina (uma vez), sempre nesta ordem.

3. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E ESPECÍFICA DE NEUTRÓFILOS

Com o auxílio de uma câmara de Neubauer dupla espelhada e de um microscópio óptico (ZEISS-West Germany), procedeu-se a contagem global de leucócitos, empregando-se um aumento de 400 vezes. Devido ao grande número destas células na amostra, a quantificação das mesmas foi efetuada levando-se em consideração o número relativo de leucócitos, situados no campo quadriculado central da câmara de Neubauer.

Para a contagem diferencial de neutrófilos, colocou-se uma quantidade padronizada da amostra em lâminas histológicas. Após a sedimentação das células, a leitura foi feita ao microscópio óptico, em imersão, no aumento de 1.000 vezes.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos para a contagem global de leucócitos, e diferencial para neutrófilos, por grupo estudado, foram tratados estatisticamente através de uma análise de variância e aplicação do teste de TUKEY, a um nível de significância de 5%.

OBS.: A composição, bem como os cuidados na preparação das soluções de ovoalbumina, PBS, PBS/heparina e líquido de TURK encontram-se descritas no Apêndice deste trabalho.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Como era esperado, 5 horas após a injeção do agente quimiotático para leucócitos (ovoalbumina), e obedecidos os demais procedimentos descritos no capítulo anterior, o fluido peritoneal dos 40 camundongos apresentou um grande número dessas células, permitindo a sua quantificação.

1. CONTAGEM GLOBAL DE LEUCÓCITOS

Os dados correspondentes à contagem global de leucócitos (número relativos), por animal estudado, e seus respectivos valores médios, dentro de cada grupo experimental, encontram-se expressos na TABELA 1.

TABELA 1. Contagem global de leucócitos (números relativos), por animal estudado, e seus valores médios, dentro de cada grupo experimental.

ANIMAL	GRUPO			
	I CONTROLE	II BETAMETASONA	III PIROXIÇAM	IV DICLOFENACO POTÁSSICO
1	184	118	216	184
2	185	87	226	176
3	186	116	246	235
4	176	112	249	236
5	171	146	221	183
6	158	126	236	180
7	180	86	241	210
8	173	105	249	196
9	186	119	241	253
10	170	120	221	191
MÉDIA	176,9	113,5	234,6	204,4

Os dados constantes na TABELA 1 foram submetidos à uma análise de variância com um critério de classificação, apresentado na TABELA 2.

TABELA 2. Análise de variância, relativa aos dados da TABELA 1.

CAUSAS DE VARIÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
GRUPO	3	72.568,9	24.190,633	73,3495
RESÍDUO	36	11.864,2	329,561	
TOTAL	39	84.433,1		

O valor de F, apresentado na TABELA 2, é significativo ao nível de 5%. Para comparar as médias de grupos, duas a duas, foi aplicado o teste de TUKEY. O valor da diferença mínima significativa (d.m.s.), ao nível de 5% de significância, é 21,87. Com base neste resultado, pode-se afirmar que, em média, o número de leucócitos computados no fluido peritoneal dos animais do Grupo III e do Grupo IV, tratados com piroxicam e diclofenaco potássico, respectivamente, são maiores do que aqueles obtidos nos animais dos Grupos I e II (respectivamente tratados com salina e betametasona). Também pode-se afirmar que, em média, os valores obtidos para o grupo II (betametasona) são menores que aqueles anotados para o Grupo I (tratado com solução salina).

A FIGURA 2, ilustra a grandeza relativa das médias:

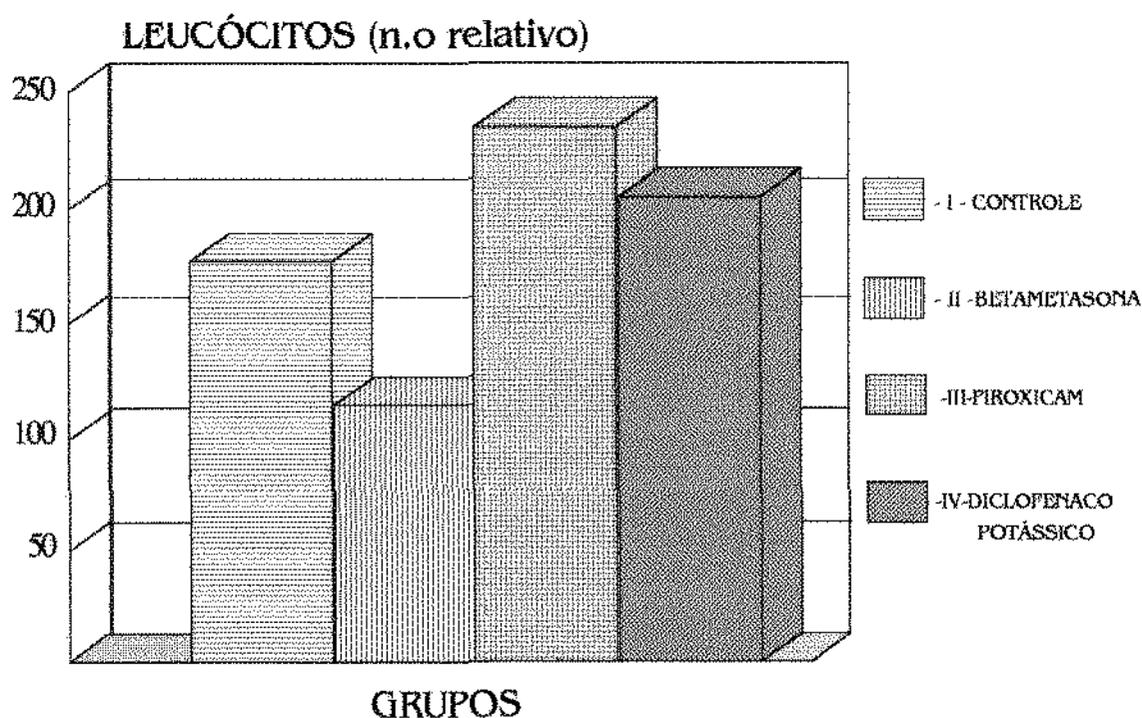


FIGURA 2 - Valores médios do número relativo de leucócitos, por grupo experimental.

2. CONTAGEM DIFERENCIAL PARA NEUTRÓFILOS

Os dados relativos à contagem diferencial para neutrófilos (expressos em porcentagem), por animal estudado, e seus respectivos valores médios, dentro de cada grupo experimental, encontram-se expressos na Tabela 3.

TABELA 3. Contagem diferencial para neutrófilos (em porcentagem), por animal estudado e seus valores médios, dentro de cada grupo experimental.

ANIMAL	GRUPO			
	I CONTROLE	II BETAMETASONA	III PIROXICAM	IV DICLOFENACO POTÁSSICO
1	28	30	30	27
2	30	27	30	36
3	30	26	28	34
4	24	27	30	38
5	28	32	35	24
6	22	22	33	28
7	33	24	28	25
8	32	19	32	26
9	30	25	32	30
10	30	23	31	27
MÉDIA	28,7	25,5	30,9	29,5

Os dados constantes da Tabela 3 foram submetidos à uma análise de variância com um critério de classificação, apresentada na TABELA 4.

TABELA 4. Análise de variância, relativa aos dados da TABELA 3.

CAUSAS DE VARIÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
GRUPO	3	167,275	55,75833	2,34635
RESÍDUO	36	855,5	23,76389	
TOTAL	39	1022,775		

O valor de F, apresentado na TABELA 4, é significativo ao nível de 5%. Para comparar as médias de grupos, duas a duas, foi aplicado o teste de TUKEY. O valor da diferença mínima (d.m.s.) ao nível de 5% de significância, é de 4,95. Com base neste resultado, pode-se afirmar que, em média, o número de neutrófilos computados no fluido peritoneal dos animais do grupo III (tratados com piroxicam), é maior que aquele obtido nos animais do Grupo II, tratados com betametasona.

Para uma melhor ilustração da grandeza relativa das médias, observar a FIGURA 3 abaixo:

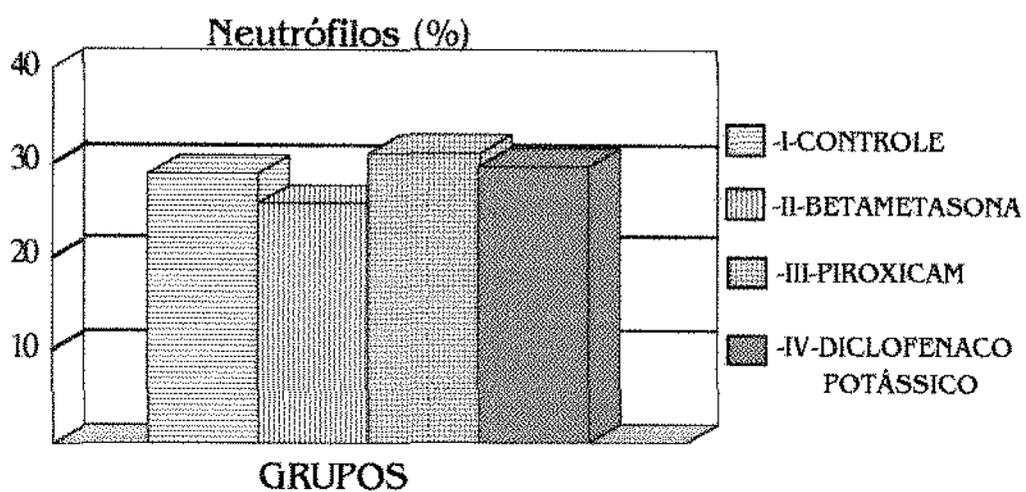


FIGURA 3. Valores médios da contagem diferencial para neutrófilos (em porcentagem - %), por grupo experimental.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

De acordo com Di ROSA (1979), a cavidade peritoneal de animais de laboratório tem sido um dos locais favoritos para o estudo das reações inflamatórias, para onde os leucócitos emigram após a injeção local de um agente irritante. Em diferentes intervalos de tempo (entre 3 a 24 horas), as células podem ser colhidas do fluído peritoneal e sua contagem determinada.

Vários tipos de irritantes (óleo mineral, endotoxinas bacterianas, glicogênio, caseína, ovoalbumina, etc.) e diferentes espécies animais (ratos, cobaias, camundongos) têm sido empregados neste estudo.

FRUHMANN (1964), observou que as células livres do fluído peritoneal são ideais para estudos morfológicos e quantitativos. Segundo este autor, existem várias razões pelas quais o fluído peritoneal do camundongo é adequado para o estudo dos leucócitos extravasculares, ou sejam:

- 1º - No camundongo não estimulado, o número e tipos de células livres do fluído peritoneal são praticamente constantes. Embora alterações rápidas e dramáticas possam ocorrer na população celular após manipulação experimental, o sistema se reequilibra e a mesma tende a retornar a níveis normais. Assim, o fluído peritoneal do camundongo parece estar sob controle de mecanismos homeostáticos.
- 2º - Substâncias injetadas intraperitonealmente provocam primeiramente uma resposta celular local. Com certeza, nenhum compartimento do organismo pode ser considerado como sendo totalmente fechado ou isolado. Se a cavidade peritoneal for inundada com grande quantidade de fluídos ou outras substâncias, sua utilidade para se estudar uma resposta local pode ser perdida. Por outro lado quando pequenas quantidades de substâncias são injetadas intraperitonealmente, algum remanescente fica localizado dentro da cavidade peritoneal por um longo período de tempo.
- 3º - Os camundongos parecem depender mais de fatores celulares do que humorais em defender a cavidade peritoneal de vários tipos de estímulos.
- 4º - Desde que o fluído peritoneal de camundongos não estimulados contém poucos neutrófilos, este é um sítio ideal para se detectar e quantificar o influxo destas células, mesmo em pequeno número.

Outro ponto da metodologia que merece uma justificativa, diz respeito às doses dos medicamentos empregados neste estudo. As doses de 0,1, 0,5 e 2 mg/Kg de betametasona, piroxicam e diclofenaco potássico, respectivamente, se constituem

na DE_{50} (dose eficaz mediana) para a inibição do edema de pata, induzido pela carragenina, um modelo de estudo clássico da inflamação mediado pelas prostaglandinas (MENASSÉ et al., 1978; MAIER et al., 1979; THIEME et al., 1982 e SCHOLER et al., 1986).

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostraram que a contagem global de leucócitos e diferencial para neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos, de acordo com o tratamento empregado, apresentou valores diferentes, estatisticamente significantes ou não.

No Grupo I (Controle), relativo aos animais tratados com solução salina, a resposta leucocitária caracterizada pela emigração e acúmulo destas células na cavidade peritoneal, deve-se inicialmente à ação da ovoalbumina, em decorrência de suas propriedades quimiotáticas. Provavelmente, numa segunda etapa, os próprios leucócitos possam ter potenciado tal fenômeno através da geração de leucotrienos, especialmente o LTB_4 , que tem propriedades quimiotáticas potentes. É importante destacar que o traumatismo provocado pela agulha hipodérmica, bem como a injeção intraperitoneal de solução salina, são fatores desprezíveis na indução da leucodiapedese, como já demonstrado por FRUHMANN (1964).

Em relação ao Grupo II, cujos animais foram tratados com a betametasona, o fluido peritoneal apresentou um menor número de leucócitos se comparado aos demais grupos experimentais. A diferença foi estatisticamente significativa, estando de acordo com os achados de outros autores que trabalharam com diferentes modelos de estudo e corticosteróides, mas com o mesmo objetivo (FRUHMANN, 1964; ISHIKAWA et al., 1969; VINEGAR et al., 1972; PERPER et al., 1974; GOLDSTEIN et al., 1976; SHEA & MORSE, 1978; THIEME et al., 1982; ANDRADE, 1985; ANDRADE, 1991).

Duas ações farmacológicas da betametasona, provavelmente interdependentes, poderiam explicar este efeito inibitório sobre a leucodiapedese. A primeira, caracterizada pela propriedade atribuída aos corticosteróides em conter a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar (FRUHMANN, 1964; STOUGHTON, 1969 e SCHAYER, 1974), através de mecanismos conjuntos como a antagonização do sistema de cininas plasmáticas (CLAMAN, 1983), atenuação da liberação de prostaglandinas (JOHNSON et al., 1982) ou ainda a indução da síntese de vasocortina (Di ROSA, 1985).

A segunda ação farmacológica refere-se à habilidade dos corticóides em diminuir a geração de leucotrienos pelos leucócitos, especialmente o LTB_4 , o qual é

responsável pelo contínuo recrutamento dessas mesmas células ao local inflamado (HIGGS & MONCADA, 1985; TAYLOR & CLARKE, 1986; FILEP, 1988).

Em relação a contagem diferencial para neutrófilos, o número destas células no fluido peritoneal dos animais tratados com a betametasona também foi menor quando comparado ao dos outros grupos, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa. Este achado pode indicar que a betametasona exerce uma ação anti-quimiotática mais potente sobre os polimorfonucleares neutrófilicos, conceito que encontra suporte nos trabalhos de VINEGAR et al. (1972), SHEA & MORSE (1978), THIEME et al. (1982) entre outros.

No que diz respeito à contagem global de leucócitos da cavidade peritoneal dos camundongos dos Grupos III e IV (animais tratados com piroxicam e diclofenaco potássico, respectivamente), esta foi significativamente maior que a computada para os demais grupos experimentais.

Estes resultados são similares aos achados de MALMSTEN et al. (1980), que trabalhando com outro AINES, a indometacina, concluíram que baixas concentrações deste fármaco aumentavam a resposta quimiotática dos leucócitos, ocorrendo o contrário quando altas concentrações eram empregadas.

Seguindo este raciocínio, MINTA et al. (1985) e MONTECUCCO et al. (1989), também já demonstraram que, *in vitro*, baixas concentrações de piroxicam e diclofenaco sódico não inibiam a migração leucocitária.

Neste momento da discussão, é interessante destacar o trabalho de IP et al. (1990), onde sugeriram que os AINES não exercem um efeito inibitório sobre a leucodiapedese de células maduras *in vitro*. Entretanto, podem suprimir a quimiotaxia no decorrer do tratamento, quando *in vivo*. Segundo os autores, este fenômeno pode ocorrer por um efeito dos AINES sobre a maturação dos leucócitos, antes da liberação destes para a circulação.

De fato, os neutrófilos são derivados de precursores da medula óssea por processo de proliferação e maturação, o qual leva aproximadamente 10 dias. O desenvolvimento da resposta quimiotática parece ocorrer no estágio de mielócito e coincide com o desenvolvimento de receptores de fatores quimiotáticos na membrana celular. Diante disto, para que os AINES mostrem uma inibição significativa sobre a migração celular, talvez fosse necessário um tratamento mais prolongado e, como decorrência, uma avaliação de seus efeitos em tempos mais tardios.

Estes conceitos também poderiam justificar, pelo menos em parte, os resultados obtidos neste trabalho, pelo fato dos AINES testados terem sido

administrados em dose única, como também pelo curto espaço de tempo de estudo (6 horas), decorrido entre a administração do fármaco e a colheita do fluido peritoneal.

Outra justificativa para os efeitos pró-quimiotáticos dos AINES, observados neste trabalho diz respeito à sua possível estimulação da migração de linfócitos, induzida por esses medicamentos, através da interleucina 1 e 2 ou pelas citocinas (HAYNES et al., 1990).

Outro ponto importante de discussão diz respeito à ação dos AINES sobre a função dos neutrófilos polimorfonucleares.

ABRAMSON et al., 1984, sugerem que os AINES parecem inibir as respostas dos neutrófilos, mas o modelo de inibição varia de droga para droga. Os AINES podem ter efeitos diretos sobre a ativação dos neutrófilos que é independente de sua participação na síntese de prostaglandinas. O piroxicam inibe a formação de superóxidos e liberação de enzima lisossomal quando o elemento reagente foi o FMLP. Já quando os agentes usados foram a concavalina A e o PMA somente se inibiu a formação de superóxidos, não ocorrendo o mesmo com a liberação de enzimas lisossomais.

Segundo ABRAMSON & WEISSMANN (1989), a ativação do neutrófilo, em resposta a um estímulo inflamatório segue uma linha geral de interação receptor-elemento reagente em células secretórias.

Uma complexa sequência de eventos segue a formação de um sinal no plasmalema. Os elementos reagentes tais como o FMLP, C5a, lecitina, leucotrieno B₄, complexos imunes, etc, ajustam-se a receptores apropriados na face externa do plasmalema e ativam o neutrófilo. Essa interação leva a hidrólise do fosfatidil inusitol 4-5 bifosfato (PIP₂) pela fosfolipase C em uma reação regulada pela proteína G (guanosina tri-fosfato). Os produtos dessa hidrólise são os dois sinais que trabalham sinergicamente para ativar o neutrófilo. Há hipóteses de que o inusitol 1,4,5 - trifosfato (IP₃), sendo solúvel em água, entra no citoplasma onde se ajusta a receptores do retículo endoplasmático ou calciossomas (organelas distintas contendo cálcio) para causar a liberação de cálcio. Já o diacilglicerol (DG) permanece associado com a membrana plasmática onde ativa a proteína C quinase a qual cataliza a fosforilação da proteína celular. Dentro de 5 a 10 segundos depois da interação do elemento reagente com o receptor, o neutrófilo é transformado em uma célula secretória capaz de provocar injúria tecidual por liberar enzimas lisossomais e radicais superóxidos.

Como os AINES são lipofílicos, eles penetram na membrana celular e rompem os eventos de sinalização normal dos neutrófilos. Como consequência, tanto a interação elemento-reagente como o movimento de cálcio são reduzidos.

Segundo os mesmos autores, os AINES só inibiriam as funções do neutrófilo, quando o estímulo empregado requisitasse um sinal de transdução via uma proteína G. Quando isso não ocorresse, os AINES não seriam ativos. Parece, portanto, que os AINES interagem com a proteína G no plasmalema dos neutrófilos e portanto, desacoplam os eventos de sinalização pós-receptor.

Isso só vem demonstrar como o tipo de agente ativador (elemento reagente) é importante. Dependendo do estímulo, os AINES poderão ou não agir de forma eficaz.

Segundo TURNER et al. (1975), a atividade da enzima 5-lipoxigenase, uma das vias de metabolização do ácido araquidônico, representa um mecanismo de controle local para amplificar o recrutamento de leucócitos em tecidos inflamados. Esta hipótese é suportada pela observação que os compostos que inibem a síntese de leucotrienos B_4 na inflamação, também reduzem o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares.

Num cuidadoso trabalho de revisão sobre o modo de ação das drogas antiinflamatórias, VANE & BOTTING (1990) argumentaram que as prostaglandinas, produtos finais da metabolização do ácido araquidônico, via cicloxigenase, não são quimiotáticos para os neutrófilos, como também não exercem um papel importante na ativação destas células. Por esta razão, acreditam que os AINES têm um discreto efeito na função dos leucócitos, o que pode explicar a pouca eficácia destes medicamentos, no tratamento das doenças inflamatórias crônicas. Prova disto é que os glicocorticóides, que inibem ambas as vias da cascata metabólica do ácido araquidônico, são potentes agentes terapêuticos no tratamento da artrite reumatóide e da bronquite asmática, podendo ser considerados como drogas antiinflamatórias clássicas.

Sendo assim, pelos resultados aqui obtidos, é tentador sugerir que os AINES exerceriam duas ações distintas: uma delas seria antiinflamatória por inibir a síntese de prostaglandinas, a outra pró-inflamatória justamente por desviar o metabolismo do ácido araquidônico para a via lipoxigenase. Teríamos portanto uma concentração maior de leucotrienos e, em decorrência disso, um recrutamento maior de leucócitos e a manutenção da resposta inflamatória aguda.

Futuros trabalhos laboratoriais ou até mesmo de cunho clínico, talvez possam esclarecer melhor esta hipótese, ratificando-a ou não..

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, nas condições em que foi realizada, pôde-se concluir o seguinte:

1. A betametasona, na dose de 0,1mg/Kg de peso corporal, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a migração de leucócitos induzida experimentalmente no peritônio de camundongos.
2. Os antiinflamatórios não esteróides, piroxicam e diclofenaco potássico, nas doses de 0,5mg e 2,0 mg/Kg de peso corporal, respectivamente, estimularam a leucodiapedese neste mesmo modelo de estudo.

RESUMO

RESUMO

Os corticosteróides, assim como os antiinflamatórios não esteróides, são largamente empregados em clínica médica e odontológica, no controle de doenças ou estados inflamatórios. Os mecanismos de ação antiinflamatória desses agentes são múltiplos e altamente complexos. Dentre estes, destacam-se aqueles relacionados à cinética e função dos leucócitos. Em função disto, objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos da betametasona, piroxicam e diclofenaco potássico, na leucodiapedese, induzida experimentalmente na cavidade peritoneal de camundongos.

Para tanto, 40 camundongos foram divididos em 4 grupos e, tratados com betametasona (0,1mg/Kg), piroxicam (0,5mg/Kg) e diclofenaco potássico (2mg/Kg), em dose única. Os animais controle receberam salina. Exatamente uma hora após os tratamentos descritos, a leucodiapedese foi induzida através da injeção intraperitoneal de um agente quimiotático. Após 5 horas deste procedimento, o fluido peritoneal foi colhido e a contagem global de leucócitos e diferencial para neutrófilos foi efetuada.

Os resultados falam a favor de uma redução significativa ($p < 0,05$) da migração de leucócitos, quando a betametasona foi empregada. Ao contrário, os AINEs estudados estimularam a leucodiapedese no mesmo modelo de estudo.

SUMMARY

SUMMARY

Corticosteroids, like non-steroidal anti-inflammatories are widely employed in medical and odontological practice in the control of inflammatory conditions or diseases. The anti-inflammatory mechanisms of these agents are multiple and highly complex. Foremost among these are those related to leukocytes function and kinetics.

As a result, the objective of this work has been to evaluate the effects of betamethasone, piroxicam and diclofenac potassium in leukodiapedesis, experimentally induced in the peritoneal cavity of mice.

For this purpose, 40 mice were divided into 4 groups and treated with betamethasone (0,1mg/Kg), piroxicam (0,5mg/Kg) and diclofenac potassium (2mg/Kg) in a single dose. The control animals received saline. Exactly one hour after the treatment described, leukodiapedesis was induced through an intraperitoneal injection of a chemotactic agent. After 5 hours the peritoneal fluid was collected and global count of leukocytes and differential for neutrophils performed.

The results speak favourably for a significant reduction ($p < 0,05$) in the migration of these cells when betamethasone was employed. On the other hand, the AINEs studied stimulated the leukocytes migration in the same study model.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - ABRAMSON, S.B. et al. Inhibition of neutrophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am. J. Med., 15: 3-6, 1984.
- 02 - _____ & WEISSMANN, G. The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Arthritis Rheum., 32: 1, 1989.
- 03 - ANDRADE, E.D. Efeitos antiinflamatórios da betametasona em preparações e posologias diferentes. Estudo experimental. Piracicaba, 1985. [Tese (Doutoramento) 87 p. - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- 04 - _____. Estudo comparativo dos efeitos da betametasona e dipirona, administradas isoladamente e em associação, sobre a migração leucocitária em camundongos. Piracicaba, 1991. [Tese (Livre-docência) 45 p. - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- 05 - BABIOR, B.M. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. New Engl. J. Med., 298(12): 659-68, 1978.
- 06 - BLACWELL, G.J. et al. Macro cortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. Nature, Lond., 297: 147-9, 1980.
- 07 - BIEMOND, P. et al. Superoxide production by polymorphonuclear leucocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: in vivo inhibition by the antirheumatic drug piroxicam due to interference with the activation of the NADPH-oxidase. Ann Rheum. Dis., 45: 249-255, 1986.
- 08 - BOGGS, D.R. et al. The effect of adrenal glucocorticoids upon the cellular composition of inflammatory exudates. Am. J. Path., 44: 763-73, 1964.
- 09 - BROWN, K.A. & COLLINS, A.J. In vitro effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human polymorphonuclear cells and lymphocyte migration. J. Pharmac., 64: 347-52, 1978.
- 10 - CLAMAN, H.N. Glucocorticosteroids I: anti-inflammatory mechanisms. Hosp. Pract., 18(7): 123-34, 1983.
- 11 - DANON, A. & ASSOULINE, G. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by corticosteroids requires RNA and protein synthesis. Nature, Lond., 273: 552-4, 1978.
- 12 - DAVIES, J.; SHEPPARD, K.; FLETCHER, J. Inhibition of human neutrophil secondary granule discharge by anti-inflammatory agents. Inflammation, 8: 343-351, 1984.

- 13 - Di ROSA, M.; SORRENTINO, L.; PARENTE, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leukocyte emigration. J. Pharm. Pharmacol., 24: 575-77, 1972.
- 14 - _____. Prostaglandins, leukocytes and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Pol. J. Pharmacol., 26: 25-36, 1974.
- 15 - _____. Inhibition of cell migration in vivo and granuloma formation. In: VANE, J.R. & FERREIRA, S.H., eds. Antiinflammatory drugs, berlin, Springer-Verlay, 1979. cap. 27, p. 223-54.
- 16 - _____ et al. Multiple control of infammation by glucocorticoids. Aq. Actions, 17: 284-9, 1985.
- 17 - DORMANDY, T.L. Free-radical reaction in biological system. Ann. Roy. Col. Surg. Eng., 62: 188-194, 1980.
- 18 - FANTONE, J.C. & WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J. Phatol., 107: 397, 1982.
- 19 - FERREIRA, S.H. Uma visão do processo inflamatório e seu controle terapêutico. Porto Alegre, Fac. Med. - Puc, 1980. (Apostila).
- 20 - FILEP, J. Leukotriene and prostanoids in health and disease. Drugs Today, 25(2): 138-42, 1988.
- 21 - FORD-HUTCHINSON, A.W. et al. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature, 286: 264-65, 1980.
- 22 - FRIMAN, C. et al. Effect of diclofenac sodium, tolfenamic acid and indomethacin on the production of superoxide induced by N-formyl-methionyl-phenylalanine in normal human polymorphonuclear leukocytes. Scand. J. Rheumatol., 15: 41-6, 1986.
- 23 - FRUHMANN, G.J. Adrenal steroids and neutrophil mobilization. Blood, 20: 355-63, 1962.
- 24 - _____. Extravascular mobilization of neutrophils. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113: 968-1002, 1964.
- 25 - GOETZL, E.J. & PICKETT, W.C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hidroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). J. Immun., 125: 1789-91, 1980.
- 26 - GOLDSTEIN, I.M. et al. Influence of corticosteroids on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. Inflammation, 1: 305-15, 1976.
- 27 - HARLAN, J.M. et al. Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. J. clin. Invest., 68: 1394-403, 1981.

- 28 - HAYNES, D.R. et al. The cyclo-oxygenase inhibitor, Piroxicam enhances cytokine induced lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo*. Immunol. Cell. Biol., **68**: 225-30, 1990.
- 29 - HIGGS, G.A. & MONCADA, S. Leukotrienes in disease. Implications for drug development. Drugs, **30**: 1-5, 1985.
- 30 - HIRATA, F. et al. A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., **77**: 2533-6, 1980.
- 31 - HOCHBERG, M.C. NSAIDS: Mechanisms and pathways of action. Hospital Practice, **15**: 185-90, 1989.
- 32 - IP, M. et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on neutrophil chemotaxis an *in vitro* and *in vivo* study. British Journal of reumatology, **29**: 363-7, 1990.
- 33 - ISHIKAWA, H.; MORI, Y; TSURUFUJI, S. The characteristic feature of glucocorticoids after local application with reference to leucocyte migration and protein exudation. Eur. J. Pharmac., **7**: 201-5, 1969.
- 34 - JANOFF, A. & CARP, H. Proteases, antiproteases and oxidants: Pathways of tissue injury during inflammation. In: MAJNO, G.; COTRAN, R.S., ed. Current topics in inflammation and infection. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1982, p. 62-82.
- 35 - JOHNSON, L.K. et al. Glucocorticoid action: a mechanism involving nuclear and non-nuclear pathway. Br. J. Derm., **107** (suppl. 23): 6-23, 1982.
- 36 - KAPLAN, H.B. et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on human neutrophil-functions *in vitro* and *in vivo*. Biochemical Pharmacology, **33**: 371-8, 1984.
- 37 - KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann. Intern. Med., **93**: 480-9, 1980.
- 38 - LACKIE, J.M. The aggregation of rabbit polymorphonuclear leucocytes (PMNs): effect of aggents which affect the acute inflammatory response and correlation with secretory activity. Inflammation, **2**: 1-15, 1977.
- 39 - LENGFELDER, E. Can anti-inflammatory drugs act as scavengeres of oxygen radicals? Ag. Actions, **15**(1/2): 56, 1984.
- 40 - MAIER, R. et al. The pharmacology of diclofenac sodium (Voltarol). Rheumatology and Rehabilitation, (Suppl. 2): 11-21, 1979.
- 41 - MAJNO, G. Inflammation and infection. Historical highligts. In: _____, COTRAN, R.S., ed. Current topics in inflammation and infection. Baltimore, Willia ms & Wilkins Co., 1982. p.1.

- 42 - MALMSTEN, C.L. et al. Leukotriene B₄: a highly potent and stereospecific factor stimulating migration of polymorphonuclear leukocytes. Acta physiol. scand., 110: 449-51, 1980.
- 43 - MENASSÉ, R. et al. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. Scand. J. Rheum., (suppl 22): 5-16, 1978.
- 44 - MINTA, J.O. & WILLIAMS, M.D. Some nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the generation of superoxide anions by activated polymorphs by blocking ligand-receptor interactions. J. Rheum., 12(4): 751-57, 1985.
- 45 - MOILANEN, E. et al. Effects of antirheumatic drugs of leukotriene B₄ and prostanoid synthesis in human polymorphonuclear leukocytes in vitro. Agents and Actions, 24: 387-94, 1988.
- 46 - MONTECUCCO, C. et al. Effect of piroxicam therapy on granulocyte function and granulocyte elastase concentration in peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Inflammation, 13: 211-20, 1989.
- 47 - MUNIAN, M.A. et al. Circadian rhythmicity in neutrophil chemotaxis. J. Rheum., 15(6): 1044-5, 1988.
- 48 - NEAL, T.M.; VISSERS, C.M.; WINTERBOURN, C.C. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs of superoxide production and granule enzyme release by polymorphonuclear leukocytes stimulated with immune complexes or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Biochem. Pharmac., 36: 2511-7, 1987.
- 49 - O'FLAHERTY, J.T. et al. A possible role of arachidonic acid in human neutrophil aggregation and degranulation. Am. J. Path., 96: 799-809, 1979.
- 50 - PALMBLAD, J. et al. Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. Blood, 58: 658-61, 1981.
- 51 - PALMBLAD, J. The role of granulocytes in inflammation. Scand. J. Rheum., 13: 163-72, 1984.
- 52 - PALMER, R.M.J. & SALMON, J.A. Comparison of the effects of some compounds on human neutrophil degranulation and leukotriene B₄ thromboxane B₂ synthesis. Biochem. Pharmac., 34: 1485-90, 1985.
- 53 - PARENTE, L. et al. Relationship between the anti-phospholipase and anti-inflammatory effect of glucocorticoid - induced proteins. Eur. J. Pharmac., 99: 233-9, 1984.
- 54 - PERIANIN, A.; GIROUD, J.P.; HAKIN, J. Stimulation of polymorphonuclear leukocytes potentiates the uptake of diclofenac and the inhibition of chemotaxis. Biochemical pharmacology, 40(9): 2039-45, 1990.

- 55 - PERPER, R.J. et al. Leukocyte chemotaxis *in vivo*. II. Analysis of the selective inhibition of neutrophil or mononuclear cell accumulation. J. Lab. clin. Med., 84: 394-406, 1974.
- 56 - ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. Inflamação e reparo. In: _____, _____, _____, ed. Patologia estrutural e funcional. 3ª ed., Rio de Janeiro, Guanabar, 1986, cap.2, p.39-82.
- 57 - SAXENA, P.N. Effect of drugs on early inflammatory reaction. Archs. int. Pharmacodyn. Ther., 126: 228-37, 1960.
- 58 - SCHAVER, R.M. Histamine and autonomous responses of the microcirculation: relationship the glucocorticoid action. Ann. N.Y. Acad. Sci., 116, 891-8, 1974.
- 59 - SCHOLER, D.W. et al. Pharmacology of diclofenac sodium. American Journal of Medicine, 80 (Suppl 4B): 34-8, 1986.
- 60 - SHEA, C. & MORSE, E.D. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by corticosteroids. Ann. clin. Lab. Sci., 8: 30-3, 1978.
- 61 - SMITH, M.J.H. & WALKER, J.R. The effects of some antirheumatic drugs on an *in vitro* model of human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis. J. Pharmac., 69: 473-8, 1980.
- 62 - SMOLEN, J.E. & WEISSMANN, G. Effects of indomethacin, 5, 8, 10, 14 - eicosatetraenoic acid, and p-bromophenacyl bromide on lysosomal enzyme release and superoxide anion generation by human polymorphonuclear leukocytes. Biochem. Pharmac., 29: 533-8, 1980.
- 63 - STOUGHTON, R.B. Vasoconstrictor activity and percutaneous absorption of glucocorticosteroids. Archs. Derm., 99: 753, 1969.
- 64 - SUGIO, K. & TSURUFUJI, S. Mechanism of antiinflammatory action of glucocorticosteroids: re-evaluation of vascular constriction hypothesis. Br. J. Pharmac., 73: 605-8, 1981.
- 65 - TAYLOR, G.W. & CLARKE, S.R. The leukotriene biosynthetic pathway: a target for pharmacological attack Tips. Amsterdam, Elsevier, 1986. p.100-3.
- 66 - THIEME, T.R. et al. *In vivo* and *in vitro* effects of dexamethasone on leukocyte migration in the rat adjuvant arthritis model. Inflammation, 6(4): 371-86, 1982.
- 67 - THOMPSON, J. & van FURTH, R. The effect of glucocorticosteroids on the kinetics of mononuclear phagocytes. J. exp. Med., 131: 429-2, 1970.
- 68 - TROWBRIDGE, H.O. & EMILING, R.C. Inflammation: a review of process. 3ª ed., Chicago, Quintessence Books, 1989. p.39-60.
- 69 - TURNER, S.R.; TAIRNER, J.A.; LYNN, W.S. Biogenesis of chemotact molecules by platelets. Nature, 275: 680-1, 1975.

- 70 - UTOH, J. et al. Effect of surgery on neutrophil functions superoxide and leukotriene production. Br. J. Surg., 75(7): 682-5, 1988.
- 71 - VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature New Biology, 231: 232-5, 1971.
- 72 - _____ & FERREIRA, S.H. Handbook of pharmacology. Berlin, Springer-Verlag, 1979. p.223-54, 348-98, 598-634.
- 73 - _____ & BOTTING, R.M. The mode of action of anti-inflammatory drugs. Postgrad. Med. J., 66 (Suppl 4): 52-517, 1990.
- 74 - VIEIRA, H.; ARAÚJO, D.; FARIA, J. Respostas leucocitárias da dexametasona em cirurgia bucal. Rev. bras. Odont., 46(2): 47-52, 1989.
- 75 - VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some characteristics of the pleural mobilization of neutrophils produced by kaolin. Apud Di ROSA, M. op. cit. ref. 15.
- 76 - WARD, P.A. et al. Evidence for a role of hydroxyl radical in neutrophil dependent tissue injury. J. Clin. Invest., 72: 789, 1983.
- 77 - WEDMORE, C.V. & WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leucocytes in inflammation. Nature, Lond., 289: 646-50, 1981.
- 78 - WEISS, S.J. et al. Role of hydrogen peroxide in neutrophil mediated destruction of cultured endothelial cells. J. clin. Invest., 68: 714-21, 1981.

APÊNDICE

APÊNDICE

Composição e cuidados na preparação das soluções:

* OVOALBUMINA (solução de 10 mg/Kg)

Ovoalbumina 100mg

Solução Salina estéril (0,9%) 10mg

OBS: Embora a ovoalbumina demore um pouco para ser dissolvida, é recomendável preparar a solução momentos antes da sua administração, evitando-se assim a contaminação da mesma.

* PBS (Phosphate Buffered Saline)

Preparar inicialmente uma solução de KH_2PO_4 (9,06 g em 1 litro de água destilada), e uma outra de K_2HPO_4 (11,6g em 1 litro de água destilada). Tomar 20ml da solução de KH_2PO_4 e 80ml da solução de K_2HPO_4 , e acrescentar 1000 ml de solução de NaCl 15M, proporcionando um volume final de 1100 ml. Separar 600ml desta solução, guardando-a sob refrigeração. Com os 500 ml restantes, preparar a solução de PBS/Heparina.

* PBS/HEPARINA

PBS 500 ml

Heparina 0,5 ml

* TURK

Ácido acético glacial 30 ml

Água destilada q.s.p. 100 ml

Cristal Violeta 0,05 g