

LUCIA HELENA C. BACCAGLINI

Este exemplar corresponde a versão final do TSE  
definitivo pelo aluno candidato Lucia Helena  
Baccaglioni e aprovado pela Comissão Julgadora  
19 outubro 1989 h. prof. Meiry.

ESTUDO DO EDEMA EXPERIMENTAL PRODUZIDO PELOS POLISOR-  
BAMOS 20, 40, 60 E 80 EM RATOS

Orientador: Prof. Dr. Urbano M. F. Meirelles

UNICAMP

-1989-

Dedico  
aos meus pais  
e, ao meu marido.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. URBANO MORATO FERRAZ MEIRELLES, pela valiosa colaboração para minha formação e como orientador deste trabalho.

À Prof<sup>o</sup> Dra. Suzana Pereira Nunes, pelas críticas e sugestões feitas a este trabalho.

À Prof<sup>o</sup> Dra. Léa Rodrigues Simioni, pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Ramalho por sua colaboração e sugestões.

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química que nos cedeu tensiômetro e viscosímetro utilizados durante a execução do trabalho.

Ao José Ilton dos Santos, pelo apoio e pela ajuda nos experimentos.

A Maria do Carmo Vasconcelos, pelo auxílio técnico.

Ao Charles Enoch Sistonen, pelos gráficos apresentados no trabalho.

Aos demais professores, funcionários e amigos do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelos ensinamentos e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho e com minha formação profissional.

## INDICE

I.	INTRODUÇÃO	
	Inflamação.....	01
	Polisorbatos.....	05
	Contra-Irritação.....	13
	Proposição.....	15
II.	MATERIAL E MÉTODOS	
	Material	
	A. Animais.....	16
	B. Equipamentos.....	16
	C. Drogas.....	19
	Métodos	
	A. Preparo dos animais.....	20
	B. Preparo das soluções e suspensões.....	21
	C. Esquema de tratamento.....	21
	D. Adrenalectomia.....	22
	E. Produção e medida do edema.....	22
	F. Apresentação dos resultados.....	23
	G. Medidas da viscosidade e tensoatividade..	24
III.	RESULTADOS.....	28
IV.	DISCUSSÃO.....	67
V.	CONCLUSÕES.....	81
VI.	SUMMARY.....	82
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

## INTRODUÇÃO

## INFLAMAÇÃO

O fenômeno inflamação pode ser compreendido como reações coordenadas de algumas funções do organismo contra lesões provocadas por agentes físicos, químicos ou biológicos, caracterizado por reações que dependem menos da natureza do agente agressivo e mais extensivamente da maneira como o organismo pode mobilizar seus recursos defensivos, (ROCHA e SILVA, 1969). Uma resposta inflamatória adequada é essencial como mecanismo de defesa contra a invasão do organismo por agentes estranhos, tendo então uma natureza pró-homeostática.

Embora seja difícil fazer uma descrição adequada do fenômeno inflamatório em termos de eventos celulares subjacentes no tecido lesado, existem certos aspectos do processo que em geral são característicos, como a fenestração da microvasculatura, o derrame de elementos do sangue para os espaços intersticiais e a migração de leucócitos para o tecido inflamado. No nível macroscópico, isso em geral é acompanhado pelos sinais clínicos familiares de eritema, calor, edema, hiperalgesia e perda de função. Durante essa complexa resposta, mediadores químicos tais como histamina, a 5-hidroxitriptamina (5-HT), vários fatores quimiotáticos, a bradicingina, leucotrienos e prostaglandinas são liberados no local. Células fagocitárias migram para a área, e membranas lisossômicas celulares podem sofrer ruptura, liberando enzimas líti- cas. Todos esses acontecimentos podem contribuir em maior ou

menor grau para a resposta inflamatória, (FLOWER e COLS., 1985).

Como fenômeno que envolve eminentemente a microcirculação, a inflamação, como tal, só pode ser estudada experimentalmente "in vivo".

As mudanças reativas que ocorrem nas primeiras horas após lesão envolvem, em intensidade variável, mudança do calibre e do fluxo dos pequenos vasos; aumento da permeabilidade, que leva à formação do exsudato rico em proteínas e a edema local. Há conseqüente aumento funcional dos linfáticos que drenam a área lesada com o objetivo precípuo de remover estas proteínas. Há também migração de leucócitos inflamatórios como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos e paquetas. Se chamarmos arbitrariamente de mediadores aos fatores endógenos participantes determinativos das respostas complexas cujo conjunto definimos como inflamação, este processo é certamente multi-mediado.

A ação desses mediadores no aumento da permeabilidade vascular na inflamação é restrita a veias e pequenos vasos, (HURLEY, 1978).

Outra importante característica da resposta inflamatória é a migração celular, caracterizada pela transferência de leucócitos de pequenos vasos sanguíneos e seu acúmulo no tecido inflamado. O primeiro evento deste processo é a marginação destas células, seguida de adesão à superfície luminal do endotélio vascular, especialmente de vênulas pós-capilares (DI ROSA, 1978). Segue-se a penetração leucocitária no endotélio dos vasos, que se faz por inserção de pseudópodes nas junções inter-endoteliais.

No edema de natureza inflamatória, o

efluxo de proteínas do compartimento vascular só ocorre através das aberturas ou "gaps", formadas a partir do encurtamento de proteínas contráteis do citoplasma das células endoteliais de modo a alargar os espaços juncionais entre endotelió citos adjacentes, em alguns segmentos vasculares.

Os capilares linfáticos que comumente se apresentam colapsados têm estruturas semelhantes aos capilares sanguíneos. Entretanto têm o endotélio mais fino e irregular, com membrana basal tênue e frequentemente ausente, existindo espaços ("gaps") mesmo em condições normais, (CASLEY-SMITH & FLOREY, 1961). Da superfície externa dos linfáticos terminais emergem delicadas fibrilas que são unidas a várias fibras conjuntivas dos tecidos adjacentes, de modo que quando se aumenta o fluído no interstício, esses filamentos de ancoragem, como foram chamados, exercem tração sobre as paredes linfáticas e conseqüentemente, provocam sua dilatação distendendo-os, aumentando o número dos espaços intercelulares endo teliais.

Quando tecidos entumescem devido ao acúmulo de exsudato inflamatório, os finos filamentos de ancoragem que unem a superfície externa das células endoteliais linfáticas a estruturas adjacentes, exercem tração externa na parede do linfático. Como resultado, os linfáticos terminais nas áreas de inflamação são largamente dilatados e mais proeminentes que os normais, devido a ação de fatores endógenos permeabilizantes produzidos no local (HURLEY, 1978). Parte do exsudato inflamatório é reabsorvido nas terminais venosas dos capilares, contudo, o volume de fluído e toda proteína deste exsudato é removido por via linfática.

Assim, em todos tipos de inflamação, o exsudato é removido da área injuriada via linfáticos, por aceleração da função linfática normal. Edema local poderia surgir na área inflamada somente quando a taxa de formação de exsudato em pequenos vasos sanguíneos excedesse a capacidade dos linfáticos de removê-lo dos espaços extravasculares, (CASLEY-SMITH, 1985).

UNGAR (1969) analisou o processo inflamatório, partindo de agressões de mínima intensidade e duação, e o gradual recrutamento de numerosos e complexos mecanismos orgânicos solicitados para cumprir o objetivo final de neutralização, eliminação e restauração das condições morfofuncionais de normalidade. Tipicamente, afirma, a inflamação é processo auto-limitado, o que se atribue à intervenção de inibidores do sistema de proteases e de enzimas, como por exemplo, cininases.

GARCIA LEME fez, em 1981, uma extensa avaliação dos mecanismos neurais e endócrinos envolvidos na reação inflamatória, analisando a participação da insulina, do glucagon e do relacionamento deste processo com sistemas neuro-sensoriais.

## POLISORBATOS

Tween (Tw) é o nome vulgar de vários agentes tensoativos não-iônicos que são derivados polioxietilênicos, ésteres do sorbitan e vários ácidos graxos. A existência de regiões hidrofóbica e hidrofílica na mesma molécula confere-lhes propriedades anfipáticas que justificam sua utilização como umectantes, solubilizantes, etc.

Conhecidas também como polisorbatos, essas substâncias são usadas na formulação de produtos farmacêuticos e cosméticos, além de amplamente utilizados em alimentos, (POLING e cols. 1956, BARNETT 1981 e TAGESSON e EDLING 1984).

Entretanto, não são entidades químicas de constituição definida, no sentido em que, ao serem produzidos em escala industrial, são identificados pelo ácido graxo que predomina quantitativamente, embora suas moléculas se completem com outros ácidos graxos. Assim, por exemplo, o Tw 80, ou polisorbato 80, é o polioxietileno-20-sorbitan monooleato, contém como ácido graxo cerca de 70% de ácido oléico mas também estão presentes o ácido linolêico, o palmítico e o estéarico. Este último predomina no Tw 60, o palmitato caracteriza o Tw 40 e o laurato é o ácido graxo mais abundante no Tw 20.

A fórmula que representa a estrutura aproximada do Tw 80 (THOMAN, 1986) permite perceber outra particularidade interessante desses polioxietileno-20-derivados, qual seja a variabilidade de posição nos grupos polioxietilênicos que perfazem o total de 20 unidades.



A influência dos polisorbatos 60 e 80, usados como aditivos alimentares, sobre a integridade e permeabilidade da mucosa intestinal de ratos foi estudada por TAGESSON E EDLING (1984), enquanto KOBAYASHI E COLS. (1974) analisaram o efeito dos polisorbatos 20, 40 e 60 na redução que provocam da velocidade de absorção de medicamentos injetados experimentalmente por via intra-muscular. A influência da concentração dos polisorbatos 20 e 80 na absorção de pomadas contendo indometacina foi estudada em coelhos, por TSAI E COLS. (1986).

A absorção gástrica do ácido salicílico é importante pelo fato de que parte substancial da aspirina ingerida é desacetilada no estômago (FLOWER e cols. 1985). COLLETT E COLS. (1973) demonstraram que o Tw 20 em solução a 1% reduz a absorção do ácido salicílico em ratos.

A importância farmacológica dos polisorbatos está bem exemplificada no trabalho de HIRAI E COLS. (1981). Esses autores avaliaram os mecanismos facilitatórios da absorção nasal da insulina por vários surfactantes e sua correlação com a atividade lítica desses compostos sobre eritrócitos, juntamente com importantes alterações ultramicroscópicas das membranas celulares atingidas.

A habilidade de modificar as propriedades biológicas de células bacterianas foi observada por ABREHEM E ZAMIRI (1980) demonstrando que o Tw 80 estimula o crescimento "in vitro" de Corynebacterium ulcerans, ao mesmo tempo em que deprime a produção de toxinas por este microorganismo, sem que haja interação direta toxina-polisorbato. Mais recentemente DESAI E COLS. (1986) verificaram que o Tw 80 aumenta a pro

dução de alcalóides por fungos do gênero Claviceps, concluindo que esta ação se dá principalmente por modificação da permeabilidade das células de Claviceps.

A produção de imunoglobulinas primárias IgE e IgG é inibida, em camundongos pré-tratados pelo Tw 80 seguida de imunização pela ovalbumina adsorvida em hidróxido de alumínio, uma combinação de antígeno-adjuvante que produz altos níveis de IgE e IgG (BARNETT, 1981).

Os efeitos da ingestão de quantidades variáveis de tipos diversos de surfactantes derivados de polioxietileno foram analisados em ratos e hamsters, por POLING E COLS. (1956) que concluíram que estas substâncias podem provocar atraso de crescimento, debilidade geral, menor aproveitamento de alimentos, maior consumo de água, aumento da mortalidade, diarréia e hemorragia do aparelho genito-urinário. EAGLE E POLING (1956) obtiveram também importantes dados sobre efeitos tóxicos agudos observados após administração oral de Tween 20 a ratos, depois de 21 semanas de tratamento quando todos os animais apresentavam nefromegalia, calculose urinária, diarréia e ulceração na base da cauda. Microscopicamente detectaram a ocorrência de atrofia dos túbulos seminíferos, obstrução dos túbulos renais, atrofia do tecido linfóide esplênico e de hepatócitos. Aproximadamente 85% dos animais exibiam redução da espermatogênese, aumento da hematopoiese extra-medular e hemosiderose da mucosa cecal.

Utilizando Tw 80 como solvente para o amiodarone, MASINI E COLS. (1985) demonstraram que parte dos efeitos observados em cães decorria da liberação de histamina, liberação esta também demonstrada em mastócitos isolados de

ratos.

A suspeita de que propriedades físicas pudessem representar papel importante na atividade biológica de várias substâncias não é recente. GLASSMAN, já em 1950, procurou relacionar a capacidade de surfactantes alterarem as propriedades físicas de soluções, com os seus efeitos deletérios em hemácias. SEEMAN E BIALY (1963) demonstraram correlação entre tensoatividade e eficácia terapêutica em uma série de dez medicamentos usados para uma mesma entidade mórbida. Um aumento de cem vezes na tensoatividade está associada a uma diminuição de cem vezes na dose oral média, em bases micromolares. Este assunto foi revisto por FELMEISTER (1972) em relação a anti-histamínicos, anestésicos locais, psicoterápicos, antibióticos, hormônios e vitaminas.

Detergentes não-iônicos modificam a motilidade do jejuno de ratos "in vitro", sugerindo correlação entre a hidrofobicidade e o efeito farmacológico destes agentes. WHITMORE E COLS. (1980) demonstraram uma diminuição do movimento pendular, 3 minutos após adição de "Brij", embora a frequência das contrações não se modificasse significativamente.

Correlação entre modificações histológicas do intestino delgado de ratos e a taxa de desaparecimento de pentobarbital e fluxo cumulativo de água depois de exposição do mesmo a soluções de detergentes foi analisada por GOWAN E COLS. (1986). Concluíram que soluções de Tween 80 têm efeito mínimo na camada mucosa e na quantidade de água do espaço intersticial. Outro estudo investigando o aumento de absorção de ácido para-aminobenzóico (APAB) no cólon de ratos

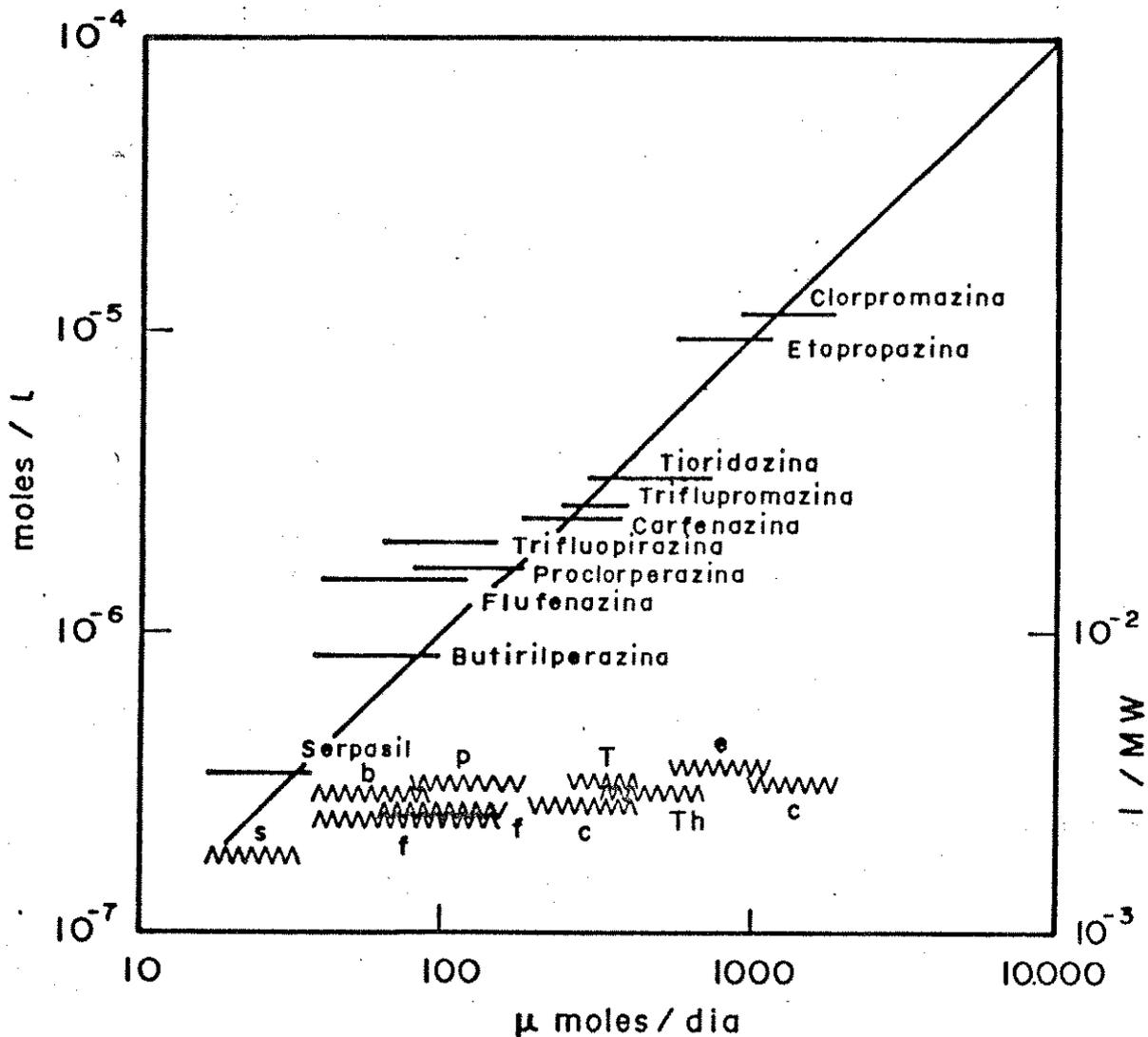


Fig. 01 - Demonstração da correlação entre atividade superficial e atividade clínica. A concentração da droga que baixa a tensão superficial de 5 dinas/centímetro está na ordenada. A abcissa representa o log da dose média utilizada. As barras pretas indicam a atividade superficial e as linhas onduladas o inverso do peso molecular. A linha inclinada é a reta teórica para uma exata correlação 1:1. Observar que um aumento de 100 vezes na atividade superficial está aproximadamente associada a uma diminuição de 100 vezes na dose oral diária, em micromoles (seg. SEEMAN E BIALY, 1963).

por surfactantes derivados de polioxietileno foi feita por SAKAI E COLS. (1986) que correlacionaram a capacidade de sequestração de  $Ca^{2+}$  dos surfactantes com sua capacidade de absorver APAB.

O esvaziamento da vesícula biliar produzido pelo Tw 80 após administração oral sugeriu a ANDRÉN E THEANDER, (1961) que poderia estar relacionado com o componente lipídico da molécula. Investigando a irritação cutânea primária produzida por vários detergentes em mamíferos, DE LEO E COLS. (1987) confirmaram, através de estudo "in vitro" com culturas de células, que ocorre remoção de substâncias tais como ácidos graxos de fosfolípidos de membrana por agentes tensoativos, como, dentre outros, o Tw 20. Concluíram que a reação inflamatória "in vivo" envolve, de algum modo, metabólitos do ácido araquidônico.

A fisiologia respiratória constitui provavelmente um dos melhores exemplos da dependência funcional de moléculas tensoativas. Com a ausência ou restrição séria do surfactante pulmonar, a expansão desse órgão torna-se muito difícil, muitas vezes exigindo uma pressão intrapleural tão baixa como -20 ou -30 milímetros de mercúrio para superar a tendência dos alvéolos ao colapso. Isso ilustra a importância do surfactante em diminuir a tensão superficial, facilitando a re-expansão alveolar. É comum principalmente em prematuros, a secreção de quantidades insuficientes de surfactante o que torna muito difícil a expansão pulmonar, constituindo a doença da membrana hialina, ou síndrome da perturbação respiratória, (GUYTON, 1986). JACOBS E COLS. (1985) estudaram em cordeiros prematuros o efeito do Tw 20 sobre parâmetros respiratórios como as trocas gasosas e a complacência pulmonar.

Não devemos confundir baixa reatividade química dos polisorbatos com reduzida capacidade de exercer ações biológicas. Com efeito, THOMAN (1986) verificou que íons biologicamente importantes podem se ligar ao Tween 80 e assim serem transportados através de membranas artificiais, o que corresponde, "in vivo" a importante ação biológica. Na utilização destes compostos em sistemas biológicos e na interpretação dos seus efeitos é necessário considerar não só suas ações diretas, mas também suas associações com outros compostos que podem ter seus efeitos potencializados. Trabalhando com Schistosoma mansoni em presença de surfactantes, KUSEL E COLS. (1982) relataram mudanças na permeabilidade do tegumento do parasita adulto, quando este esteve exposto ao complexo Tw 20-retinol, propondo haver sinergismo entre o tensoativo e o álcool, originando complexo molecular que seria responsável por alterações na membrana do parasita, as quais não ocorrem quer com um, quer com outro, isoladamente. Esta observação sugere que durante o desenvolvimento do parasita, alterações da sua organização molecular ou de sua composição ocorrem na fase lipídica da membrana e mostra ainda que os Tw interferem de maneira diferente na forma adulta e na forma conhecida como esquitossômula, sendo também dependentes de variações de temperatura, por exemplo, no intervalo de 4 a 37°C.

### CONTRA-IRRITAÇÃO

BONTA define contra-irritação como a propriedade pela qual um processo irritativo provoca inibição do desenvolvimento de uma reação inflamatória simultânea no mesmo organismo. A supressão da dor ou da reação local, pela aplicação de um processo irritante em local remoto já foi documentada experimentalmente em animais e também em humanos. Os processos envolvidos, parecem ser altamente dependentes do tipo de reação inflamatória em que ambos, o indutor da contra-irritação e o processo que é influenciado por este, têm que ser considerados. BONTA, (1978).

Durante a contra-irritação não somente mediadores inflamatórios são produzidos, como também substâncias anti-inflamatórias são descarregadas na circulação, atingindo outros locais, inibindo a reação inflamatória, (LADEN E COLS. 1958). ROBINSON E ROBSON (1964), confirmaram que várias substâncias são liberadas no sítio da irritação produzida pela implantação de "pellets" de poliéster, exercendo ações anti-inflamatórias à distância no mesmo organismo.

Até o presente, muitos dos dados sobre contra-irritação derivam de experimentos em que o edema de perna de ratos foi usado como modelo frequentemente representativo de processo inflamatório agudo. Entretanto, a inibição de uma reação inflamatória por irritação em uma área distante não se restringe a processos agudos. A formação de granuloma pela implantação de "pellets" de algodão ou pela injeção de

uma suspensão de carrageenina, a cicatrização de feridas, ou ainda o componente artrítico da doença auto-imune provocada pela adjuvante de Freund são também susceptíveis de inibição por contra-irritação, (BONTA, 1978).

BILLINGHAM E COLS. (1969) analisaram propriedades anti-inflamatórias presentes no exsudato produzido pela aplicação subplantar de carrageenina em ratos, concluindo que o mecanismo da inibição não envolvia mediação pelo adrenocórtex. Entretanto, foi demonstrado neste laboratório que o processo contra-irritativo experimental ocorre em animais adrenalectomizados. Portanto, a redução da reação inflamatória decorre de, pelo menos, dois componentes: um, sob dependência funcional do adrenocórtex e outro independente dele, (CASTRO, 1986).

O processo contra-irritativo é de ocorrência muito mais frequente do que se suspeita. Depende fundamentalmente da natureza do composto químico irritante, da natureza do processo inflamatório, sua localização no organismo e, criticamente, do tecido com o qual se pôs em contato o agente contra-irritante. O fenômeno de contra-irritação foi amplamente revisto por BONTA (1978).

## PROPOSTA

Objetivamos neste trabalho determinar a capacidade dos Tweens 20, 40, 60 e 80 provocarem edema quando injetados por via subplantar na pata posterior de ratos, bem como algumas características da evolução desse edema e sua susceptibilidade à inibição por várias substâncias. Decidimos também estimar os parâmetros físico-químicos viscosidade e tensoatividade, procurando detectar eventual correlação com a edema-gênese.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

- A. Animais
- B. Equipamentos
- C. Drogas

### MÉTODOS

- A. Preparo dos animais
- B. Preparo das soluções e suspensões
- C. Esquema de tratamento
- D. Adrenalectomia
- E. Produção e medida do edema
- F. Elaboração e apresentação dos resultados
- G. Medidas da tensoatividade e viscosidade

## MATERIAL

### A. ANIMAIS

Os animais utilizados na execução do trabalho foram ratos machos Wistar, com peso variando entre 140 a 200 gramas provenientes do Biotério da UNESP, campus de Botucatu.

### B. EQUIPAMENTOS

B1. O volume de edema foi medido através do uso de um pletismógrafo, aparelho de vidro e conexões de borracha conforme o esquema abaixo:

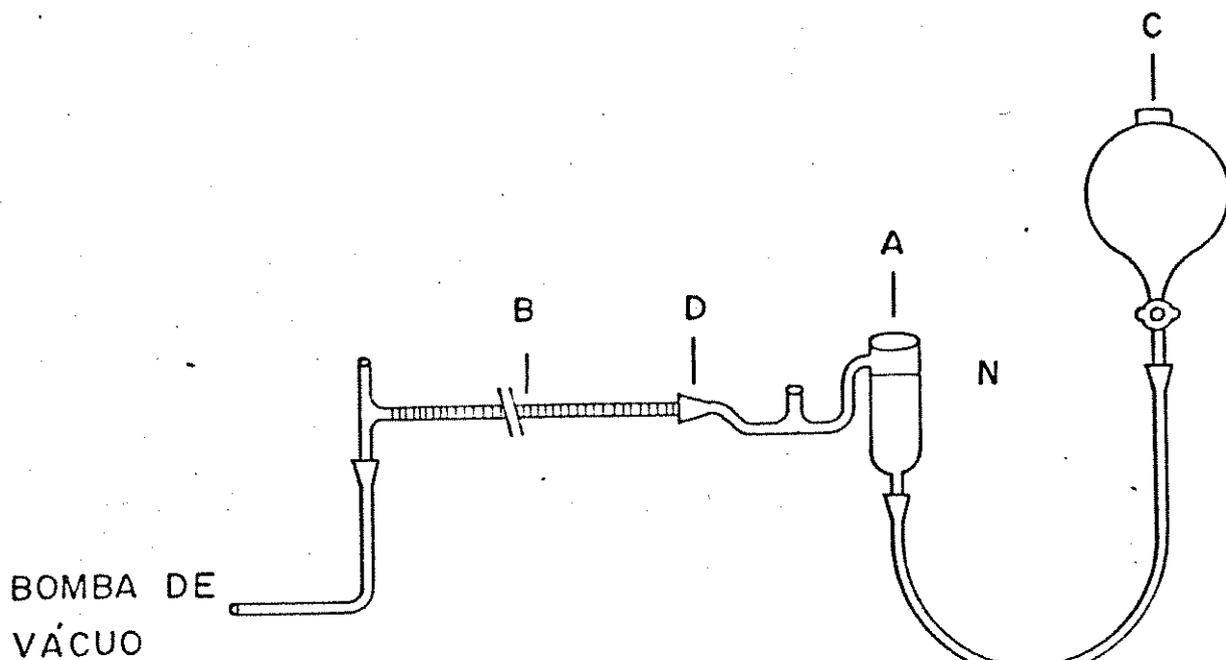


Fig. 02 - Esquema do pletismógrafo. - A: cuba para imersão; B: tubo com escala graduada; C: reservatório da solução de lauril-sulfato de sódio; D: junção de borracha onde se insere agulha para ajuste do zero; N: nível de solução na cuba, (segundo WINDER E COLS., 1957).

B2. A medida da tensão superficial das diferentes soluções foi executada através de um Tensiômetro Digital K 10T Kruss, conforme o esquema:

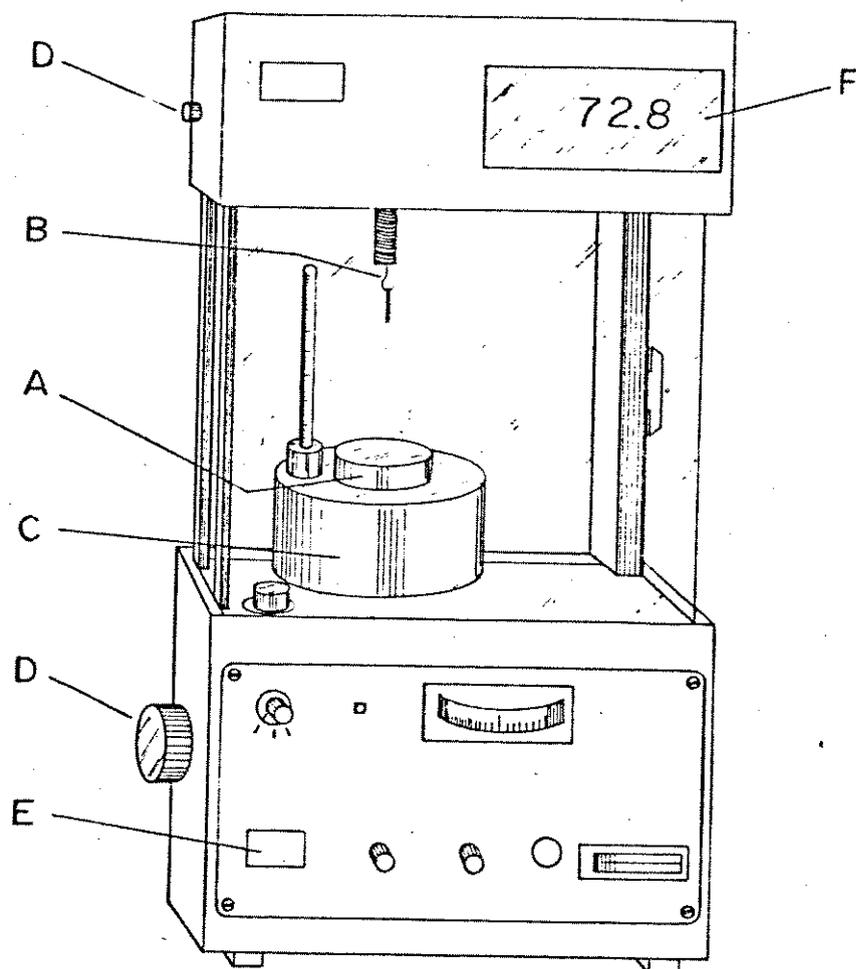


Fig. 03 - Esquema do tensiômetro. A: cuba para deposição da amostra; B: gancho para suspensão de uma placa de platina; C: reservatório com água circulante para manutenção da temperatura constante; D: dispositivos para zerar o aparelho; E: acionador do mecanismo elevador da cuba; F: visor para leitura digital (em dinas por centímetro).

B3. A viscosidade das soluções de Tweens foi medida com auxílio de um viscosímetro "Synchro-Lectric for Hazardous locations-Brookfield", esquematizado abaixo:

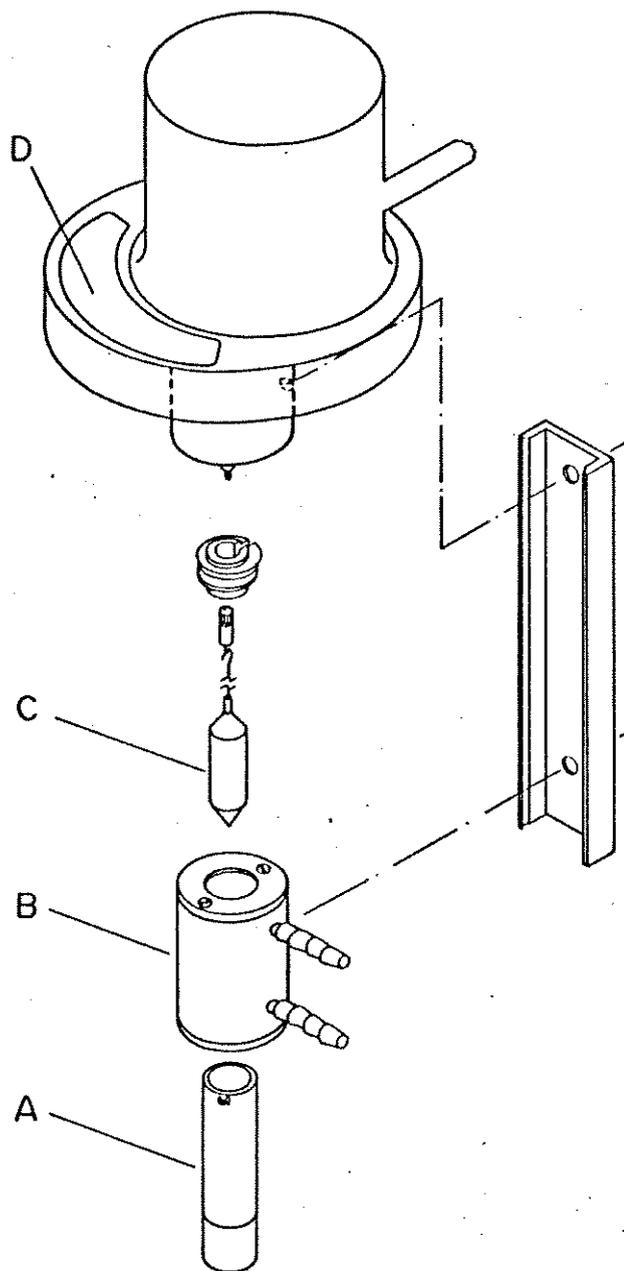


Fig. 04 - Esquema do viscosímetro. A: câmara removível para amostra; B: reservatório com água a 25°C; C: fuso cilíndrico giratório; D: escala graduada.

## C. DROGAS

Ácido acetil salicílico (AAS).....	Bayer
Ácido benzóico (AB).....	Reagen
Ácido salicílico (AS).....	Merck
Carbonato de sódio.....	Reagen
Carrageenina (CRRG).....	Sigma (tipo IV)
Dexametazona (DXMT).....	Merck Sharp & Dohme
Endosprin (AAS-lis).....	SKF
Éter etílico.....	Merck
Indometacina (IDMTC).....	Merck Sharp & Dohme
Solução fisiológica (SF).....	
Terfenadina (TFND).....	Sigma
Tween 20 (Tw 20).....	Riedel
Tween 40 (Tw 40).....	Sigma
Tween 60 (Tw 60).....	Sigma
Tween 80 (Tw 80 ou Tw 80 R).....	Riedel
(Tw 80 M).....	Merck

## MÉTODOS

### A. Preparo dos animais

Os ratos chegavam em lotes de 100 animais e eram mantidos em caixas de polipropileno com 58 x 30 x 15 centímetros, contendo 5 animais em cada uma, onde recebiam ração granulada Labina (Purina) e água "ad libitum" e tinham como cama, palha de arroz. Periodicamente estes animais eram separados por peso, a fim de manter em uma dada caixa animais formando grupos homogêneos em relação a esta característica.

No dia anterior ao experimento os animais eram marcados com números de 1 a 20, na cauda, pesados, e a seguir sorteados em 4 grupos experimentais iguais, sendo mantidos em jejum sólido por 12 horas antes do primeiro tratamento. Durante o experimento, com leituras até 7 horas, ficavam também sem acesso à água.

No dia do experimento, iniciado sempre entre 7:00 e 8:00 horas, eram trocados de gaiolas e repesados, anotando-se a perda de peso que sofreram durante o jejum. A seguir, na pata posterior direita, eram marcados com tinta preta indelével formando uma faixa fina, em anel, em torno da articulação tíbio-társica. Feita a primeira medida que constitui o "controle" os animais eram, a seguir, na região subplantar desta mesma pata marcada, submetidos à aplicação do agente flogógeno em volume de 0,1 ml.

## B. Preparo das soluções e suspensões

Para aplicação subplantar, as suspensões dos Tweens foram preparadas em solução fisiológica 0,9%, salvo indicação em contrário. Por serem muito viscosos, grande quantidade dos Tw ficava aderida a parede da pipeta durante o preparo das suspensões. O ato de soprar a pipeta produzia bolhas indesejáveis. Foram então utilizados tubos iguais de vidro que após colocação de certo volume de água, foram marcados com tinta a nível do menisco e assim preparadas as diferentes suspensões (volume/volume).

Para administração intra-gástrica as soluções foram preparadas em água destilada, perfazendo sempre volume de 2,0 ml. A indometacina (IDMTC) foi preparada em solução aquosa de carbonato de sódio acrescida de etanol (6% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 14% de etanol e 80% de SF para dose de  $15 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ).

## C. Esquema de tratamento

Para injeção subplantar, as soluções dos Tw foram aplicadas por meio de seringa de tuberculina munida de agulha 20 x 6, no centro da região subplantar da pata posterior direita dos animais, sistematicamente em volume de 0,1 ml, no tempo zero, a partir do qual se marcavam os horários das outras leituras.

Para as administrações intra-gástricas dos antagonistas foram utilizadas cânulas de polietileno adaptadas a seringas hipodérmicas de vidro, de 3,0 ml de capacidade. As soluções foram administradas sempre em volume de 2,0ml,

1 hora ou 30 minutos antes da aplicação subplantar dos Tweens.

#### D. Adrenalectomia

Após a tricotomia na região a ser aberta e com os animais levemente eterizados, foi feita uma única incisão na região média dorsal e rebatida a pele, fez-se divulgação da camada muscular a nível da última costela. Fenestrado o peritônio e expostas as glândulas adrenais, foram estas excisadas completamente, à exceção dos animais com operação simulada, cujas glândulas permaneceram intactas. Recompоста a musculatura, foi dado um ponto de sutura na pele. No período pós cirúrgico as animais receberam além da dieta usual, solução aquosa de NaCl 0,9% em substituição a água de bebida. Três dias depois da adrenalectomia tinha início a fase inflamatória do experimento, ao fim da qual os animais foram necropsiados para confirmação de ausência das adrenais.

#### E. Produção e medida do edema

Os animais, foram repesados, remarcados e submetidos a uma leitura prévia do volume de suas patas. Com auxílio de seringa de insulina e agulha 20 x 6 perfeitamente limpas e secas, as suspensões recém homogenizadas, em volume de 0.1 ml, eram então injetadas na região subplantar das patas posteriores direitas previamente limpas com algodão embebido em álcool 70%. Na retirada da agulha, a região era comprimida por alguns segundos com o dedo do experimentador sobre o ponto da perfuração, procedimento que visava impedir o

retorno do material injetado.

A primeira leitura era efetuada aproximadamente 30 minutos antes da aplicação do polímero por via sub-plantar. As demais, foram realizadas nos tempos 1/2, 1, 1 1/2, 2, 3, 4, 5 e 7 horas, sempre a partir da injeção sub-plantar do flogôgeno. Ao longo do experimento os animais foram mantidos em jejum, em ambiente cuja temperatura variou entre 24 e 28°C.

AS medidas foram efetuadas imergindo-se a pata posterior até a marca previamente feita com tinta, a nível da articulação tíbio-társica, observando-se a ordem de tratamento dos vários experimentais.

#### F. Elaboração e apresentação dos resultados

O volume ( $V'$ ) de edema é a diferença entre o volume medido em determinado tempo ( $V_t$ ) e o volume inicial ( $V_0$ ) obtido antes de qualquer tratamento.

A conversão a microlitros é feita multiplicando-se  $V'$  por um fator ( $f$ ) cujo valor é obtido nas condições de cada experimento, sendo a média de cinco leituras do volume deslocado na coluna líquida horizontal, quando se adiciona exatamente um ml da solução de lauril sulfato de sódio na cuba de imersão.

Os volumes assim obtidos dos cinco animais de cada grupo experimental, dão origem a uma média que corresponde a um ponto nas figuras que mostram a evolução do edema, em o tempo considerado.

Com esse esquema experimental pode-se acompanhar passo a passo as variações do edema agudo, por meio das curvas obtidas pela união dos vários pontos.

A análise da significância da diferença entre as curvas foi feita considerando-se duas curvas diferentes entre si quando três ou mais pontos medidos diferirem significativamente à nível de 5%, pela aplicação do teste "t" de Student.

#### G. Medidas da tensoatividade e viscosidade

Depois de preparadas, as suspensões foram deixadas em repouso para saída de eventuais bôlhas, enquanto os aparelhos eram ligados, calibrados e zerados. As medidas da tensoatividade e da viscosidade foram realizadas sempre à temperatura de 25 °C, mantida por meio de um banho termostatizado.

Para as medidas de tensoatividade, no aparelho já zerado, 13 ml da suspensão foram colocadas em sua cuba de vidro, previamente limpa e seca.

A medida feita pelo aparelho é baseada no método da placa de Wilhelmy (ADAMSON, 1976); o líquido é elevado gradualmente até tocar a placa suspensa conectada a uma balança. O aumento de peso pode então ser calculado pela seguinte equação:  $\gamma \cos \theta = \Delta W/p$  onde  $W$  é a modificação da força exercida pela placa quando colocada em contato com o líquido,  $p$  é o perímetro da placa e  $\theta$  é o ângulo de contato. O

valor da tensoatividade aparece então no visor do aparelho já em dinas/cm. Foram feitas duas medidas de cada uma das soluções. Foi usado sempre o valor da segunda medição que se mostrou constante em testes preliminares.

Alguns cuidados especiais eram necessários antes de se executarem medidas da tensoatividade. A cuba de cristal era sempre deixada em solução sulfo-crômica por trinta minutos antes e após o uso. A placa de platina, sem nenhum contato manual, era lavada com álcool, queimada em chama azul e recolocada no aparelho.

No viscosímetro foram, com auxílio de uma proveta, aproximadamente 8 ml da suspensão a ser medida na câmara que a seguir era encaixada ao eixo do aparelho. Verificada a velocidade a ser utilizada, efetuavam-se duas medidas de cada uma das soluções. Nesse método, comumente chamado de Couette, o líquido é colocado em contato com o componente giratório do aparelho. Por causa da viscosidade do fluido, há resistência ao movimento rotacional que induz ao torque cuja intensidade aumenta com a viscosidade do fluido, (HIEMENZ, 1977). O valor obtido era então multiplicado por um fator correspondente a cada velocidade, encontrando-se assim a viscosidade da solução diretamente em centipoises.

Medidas anteriores feitas em nosso laboratório do deslocamento dos Tweens puros sobre prancha de vidro e também do escoamento em pipetas, de suspensões a 25% preparadas em água destilada, concordam com os valores obtidos no viscosímetro.

Para realização destas medidas utilizamos

uma superfície de vidro de 62 x 48 cm, previamente limpa e dividida em faixas iguais graduadas marcadas com tinta em todo o comprimento, conta-gôtas de poliestireno e pipeta de 0,2 mililitros.

Na prancha foram feitas as medidas (milímetros) do deslocamento dos Tweens colocados em quantidades iguais em 5 pontos colaterais, após o que a prancha era colocada em ângulo de 30° e o cronômetro acionado. Foram realizadas 3 medidas para cada grupo de 5 amostras dos Tweens.

As medidas feitas na pipeta foram repetidas por 10 vezes para cada amostra.

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

A curva indicativa do volume de edema produzido pelos polisorbatos em determinadas concentrações por nós utilizadas é polifásica. No início podemos observar uma ascensão rápida até aproximadamente 70% do volume máximo, já aos primeiros trinta minutos após a injeção subplantar. Numa segunda fase, o edema aumenta, porém sua curva ascendente é caracteristicamente diversa, indicando acumulação mais lenta, até atingir um pico, geralmente entre a primeira e segunda horas. A seguir podemos observar uma fase de predomínio da reabsorção sobre o efluxo e, aproximadamente na segunda hora, uma definição da inclinação que medirá a velocidade de reabsorção da maior parte do edema. É o que se pode constatar caracteristicamente pela figura 05. O paralelismo entre as três curvas é bem evidente na primeira fase, após os 30 minutos, mantêm-se na segunda fase, até a segunda hora e ao longo da terceira fase, até a 7ª hora.

As características da evolução do edema de pata provocado pelo Tw 80 a 25, 27 e 30% estão mostradas no experimento representado pela figura 06. Observamos seu rápido desenvolvimento, atingindo 500 ul ou mais já aos 30 minutos da administração, e volume máximo de 800 ul ou mais, após uma hora. A partir daí predomina a reabsorção sobre a formação de edema, enquanto que o veículo aplicado nas mesmas condições a um grupo de cinco animais produz apenas discreto edema, sendo completamente reabsorvido antes da segunda hora. Notar a super

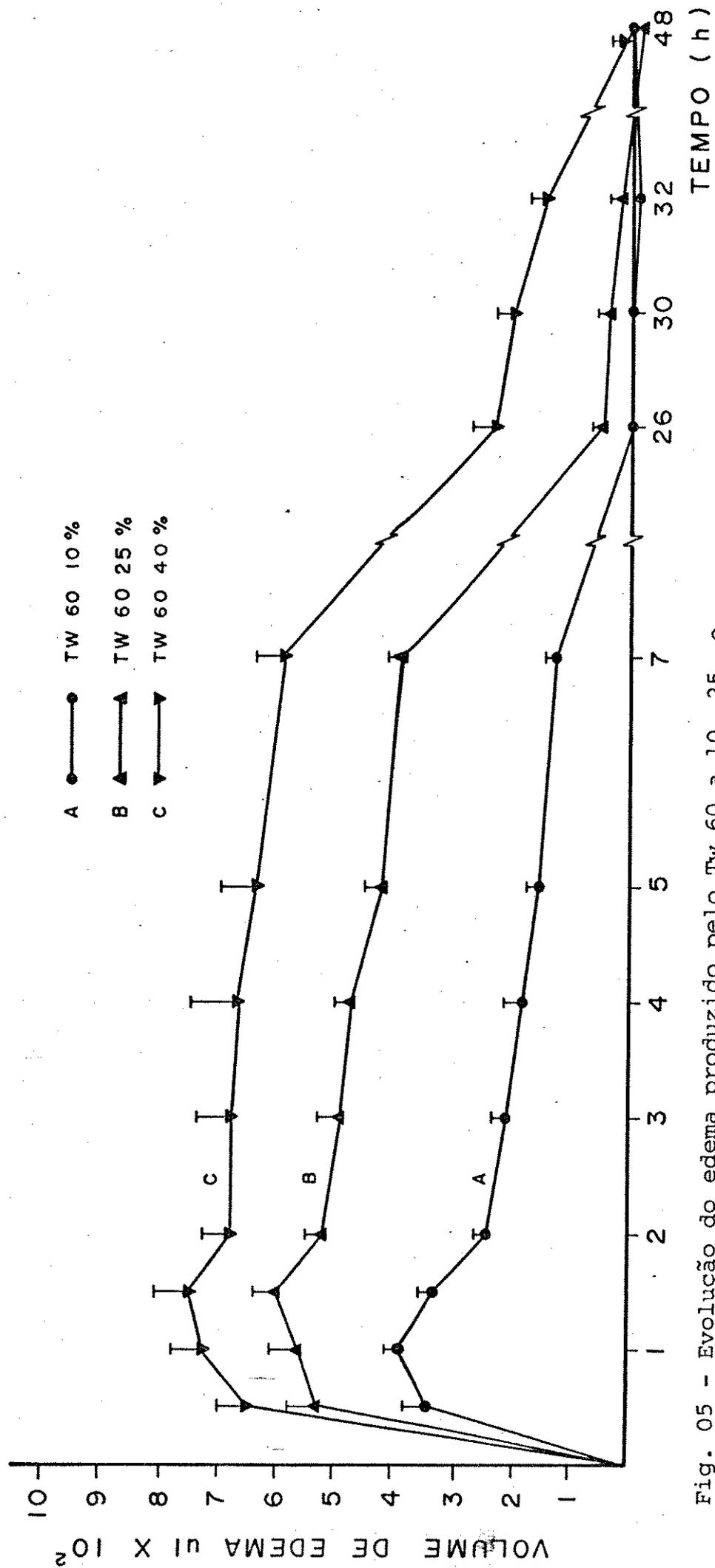


Fig. 05 - Evolução do edema produzido pelo Tw 60 a 10, 25 e 40% em SF. Cada ponto é média de cinco determinações por tratamento. Para esta e demais figuras, as barras verticais indicam erros-padrão da média. A significância foi medida pelo teste "t" de Student para  $P < 0,05$ . São significantes as diferenças: AxB, AxC e BxC.

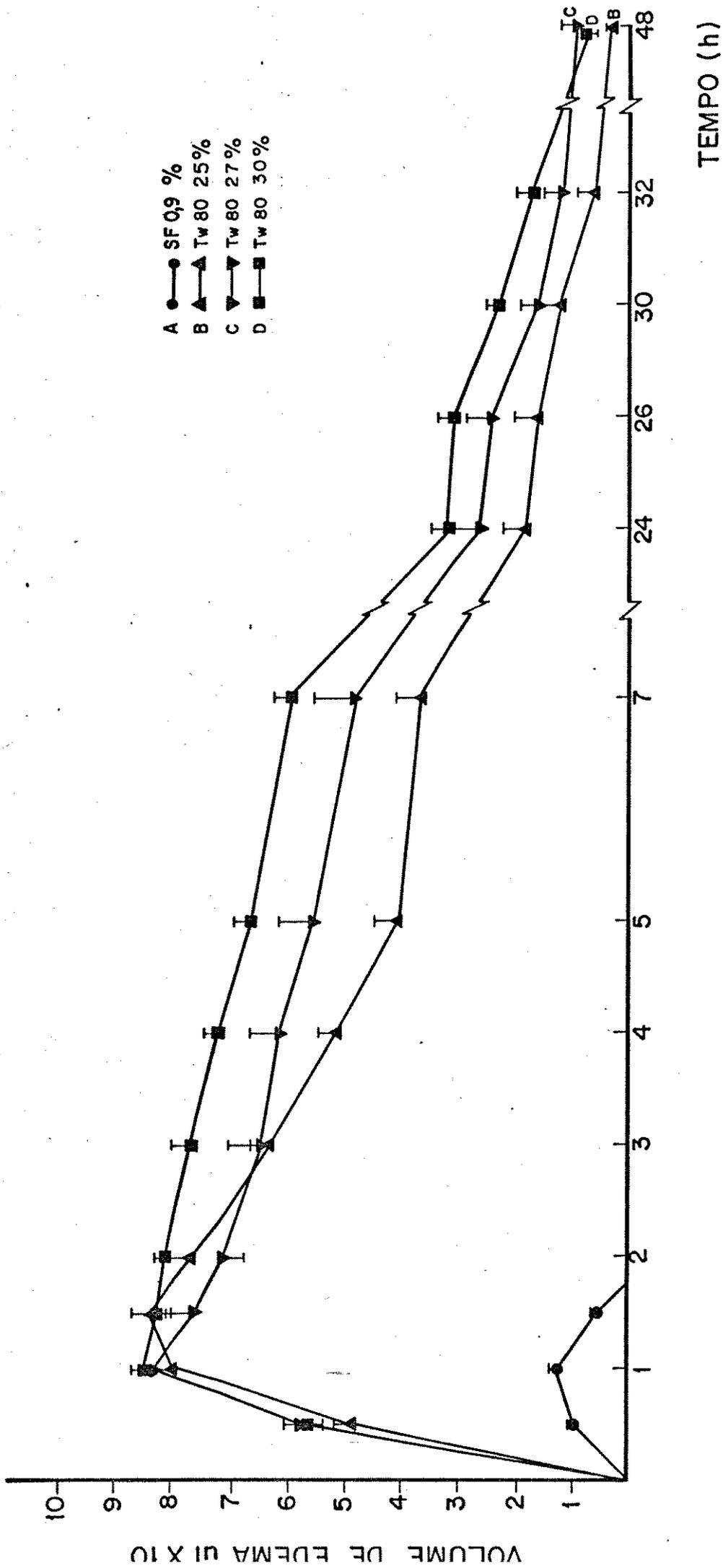


Fig. 06 - Relação entre várias concentrações de Tween 80 e as respostas edemagênicas que produzem. É significante apenas a diferença BxD.

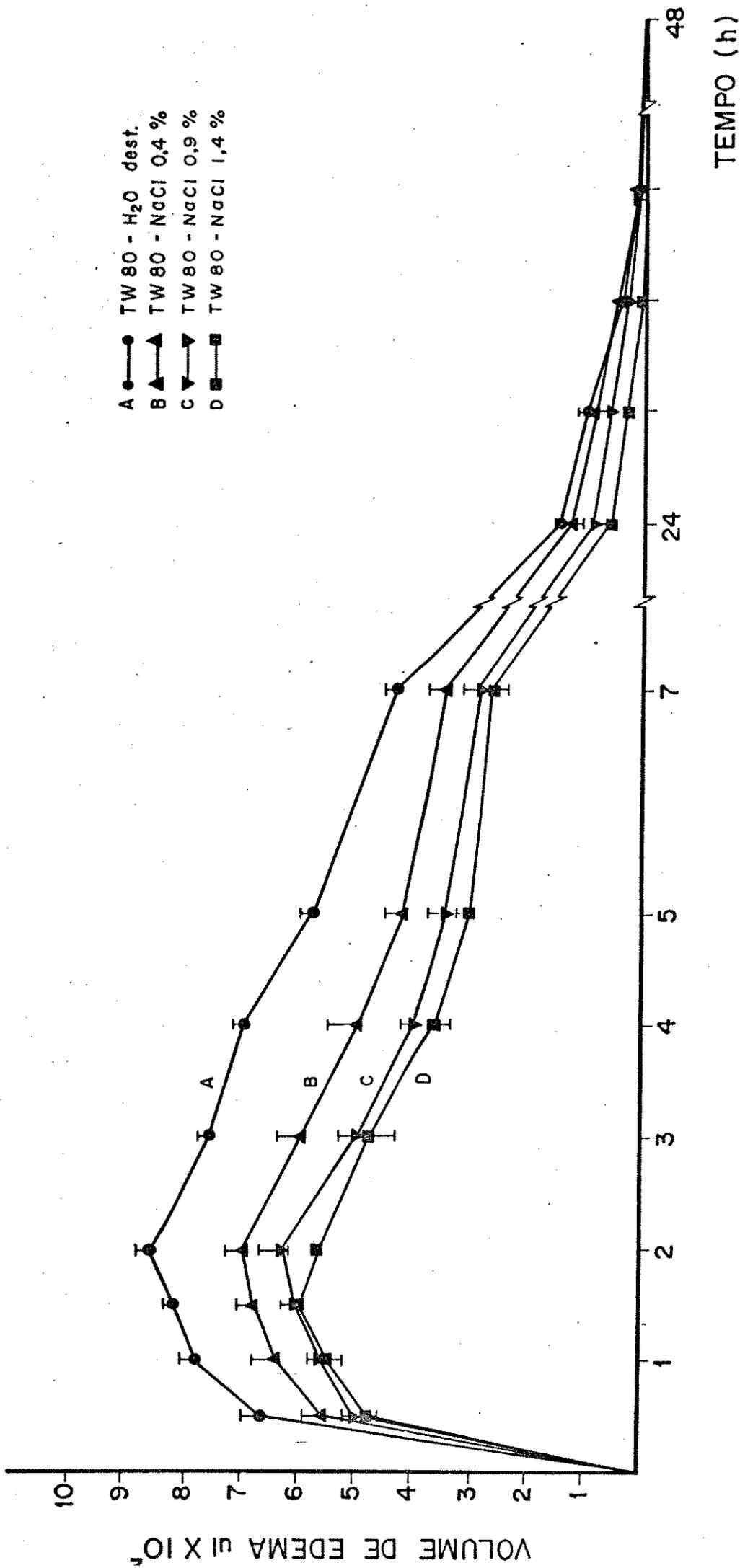


Fig. 07 - Evolução do edema produzido pelo Tween 80 a 25% em solução aquosa de NaCl a 0,4, 0,9 e a 1,4% ou em água destilada. São significantes as diferenças: AxB, AxC, AxD e BxD.

posição das curvas correspondentes às concentrações de 27 e 30% ao longo da 1ª hora e, a partir daí, a dissociação das curvas, mantendo-se C e D paralelas até pelo menos a 7ª hora. Podemos observar que para menor concentração de Tw 80 aplicado ao tecido subcutâneo, entre a 2ª e 5ª horas a diminuição do volume de edema é mais acentuada. Para o nível de significância escolhido, o edema provocado pelo Tw 80 a 30% difere significativamente daquele produzido pela concentração de 25 mas não de 27%.

A possível influência do eletrólito na evolução do edema produzido pelo Tw 80 a 25% foi estudada, dissolvendo-se o surfactante em água destilada desionizada, e em soluções de NaCl nas concentrações de 0,4 0,9 e 1,4%. É o que mostra a figura 07. Verificamos que o aumento da concentração do NaCl na solução solvente reduz proporcionalmente a reação edemagênica. A menor concentração de NaCl utilizada, 0,4%, produz edema que já difere significativamente daquele em que o Tw 80 foi dissolvido em água.

Medidas da viscosidade e da tensoatividade para os diferentes Tw "in natura" ou em solução aparecem na tabela 1.

**TABELA 1** - Medidas da viscosidade (V) em centipoise, e da tensoatividade (T) em dinas por centímetro dos Tw 20, 40, 60 e 80.

Tween conc.	20		40		60		80	
	V	T	V	T	V	T	V	T
100%	412.5	31.5	576.0	30.9	3,375.0	29.6	505.0	31.3
50%	226.0	30.1	351.0	28.6	7,500.0	24.6	--	--
25% (*)	6.1	33.1	5.2	32.1	5.7	33.3	7.8	32.8
25%	9.0	33.1	11.0	31.5	11.2	33.1	12.5	31.9

(\*) única preparada em água destilada.

Nota-se que para alguns destes compostos a diluição produz queda da viscosidade quando diluídos a 50% em relação ao valor obtido para o surfactante puro. Para todas suspensões preparadas a 25%, ocorre elevação da medida da viscosidade quando o solvente é SF 0,9% em contraste com o que se observa quando dissolvidos em água destilada. Observa-se também que as medidas da tensoatividade pouco variam entre os diferentes compostos, à exceção do Tw 60 a 50%.

TABELA 2 - Escoamento relativo de soluções aquosas a 25% em água destilada dos Tweens 20, 40, 60 e 80.

Tween	$\bar{X} \pm SEM$ (segundos)	Coefficiente Var. (%)
20	123.4 $\pm$ 6.1	4.9
40	37.8 $\pm$ 1.0	2.6
60	51.6 $\pm$ 3.0	5.8
80	276.4 $\pm$ 10.3	3.7

Os dados da tabela 2 mostram-se concordantes com nossas medidas viscosimétricas (tabela 1), isto é, os polisorbatos em solução aquosa a 25% têm velocidade de escoamento relativo na seguinte ordem decrescente: Tw 40 Tw 60 Tw 20 Tw 80.

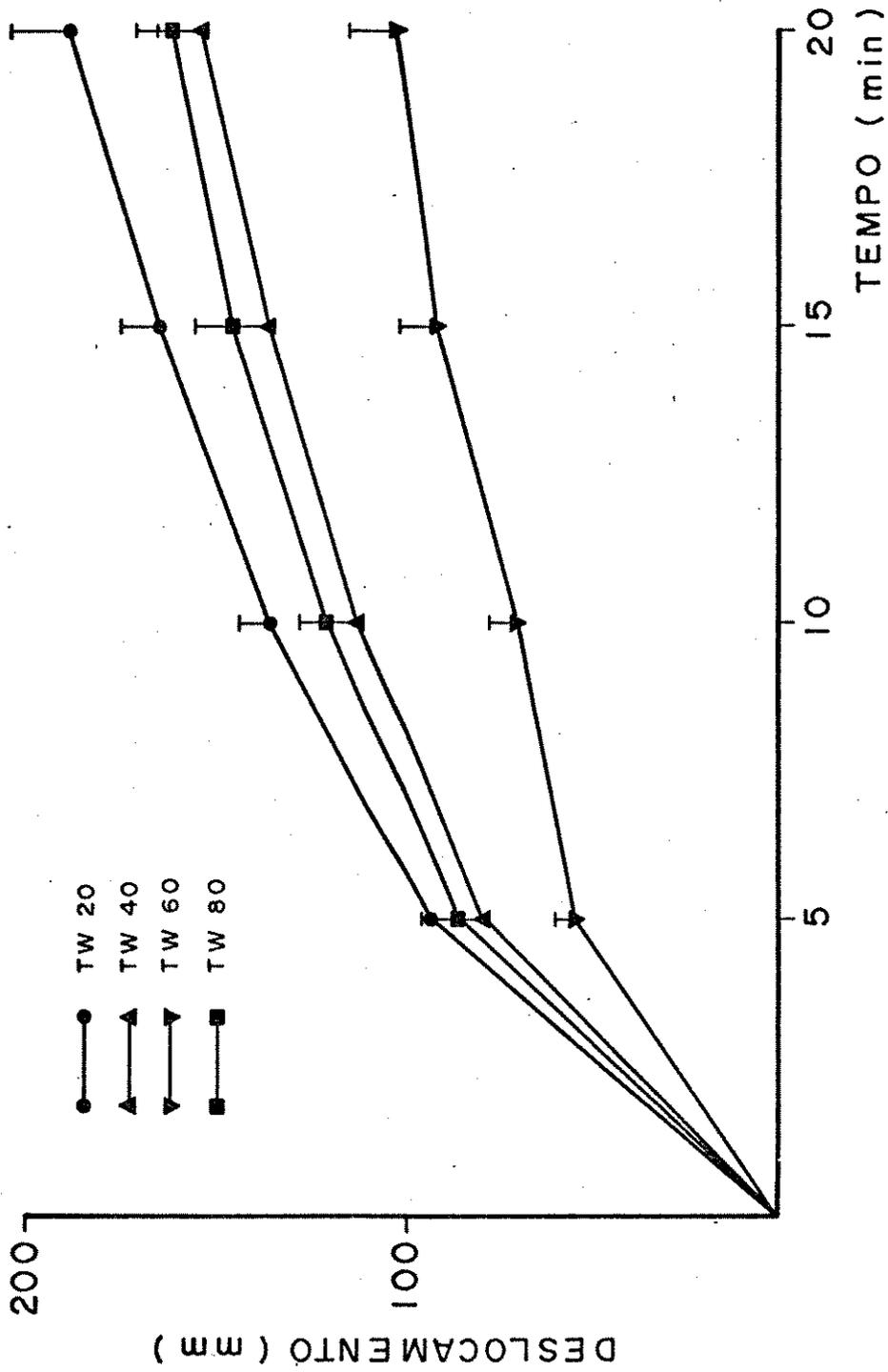


Fig. 08 - Velocidade relativa de deslocamento dos Tweens "in natura", no plano inclinado. Temperatura  $26 \pm 1$  C. Umidade relativa do ar, 64%. Cada ponto é média de 8 determinações.

Com o objetivo de observar se substâncias normalmente utilizadas como solvente são por si só capazes de provocar alterações de volume nas patas dos animais, estudamos o efeito da aplicação subplantar de água destilada e de soluções de NaCl a 0,4, 0,9 e 1,4% na pata dos ratos. Notamos então (figura 09), que o maior volume de edema é provocado pela solução de NaCl a 0,4% com resposta máxima de 210 ul, e o menor pela de 1,4% com apenas 160 ul. Não são significantes as diferenças entre as respostas produzidas nos diferentes grupos tratados. Nesse mesmo contexto procuramos medir as respostas produzidas pela IDMTC preparada em veículo próprio e as provocadas pelos vários componentes de seu solvente quando aplicados por via subplantar em ratos. Observamos (figura 10), que por esta via, a IDMTC produz volume médio máximo de 750ul quando dissolvida em água alcalinizada por solução de carbonato de sódio a 0,2% e adicionada de etanol 0,5% em volume. "Dissolvida" apenas em SF, a IDMTC, na mesma concentração, produz pouco mais que 400 ul de edema. As respostas produzidas pela aplicação de SF-carbonato de sódio e SF-etanol não diferem significativamente.

O papel realmente representado pelas propriedades físico-químicas dos polisorbatos na gênese do edema inflamatório por eles produzido não pode ser adequadamente analisado sem que se tenha uma idéia detalhada da participação de fatores ligados aos próprios veículos usados na diluição desses surfactantes.

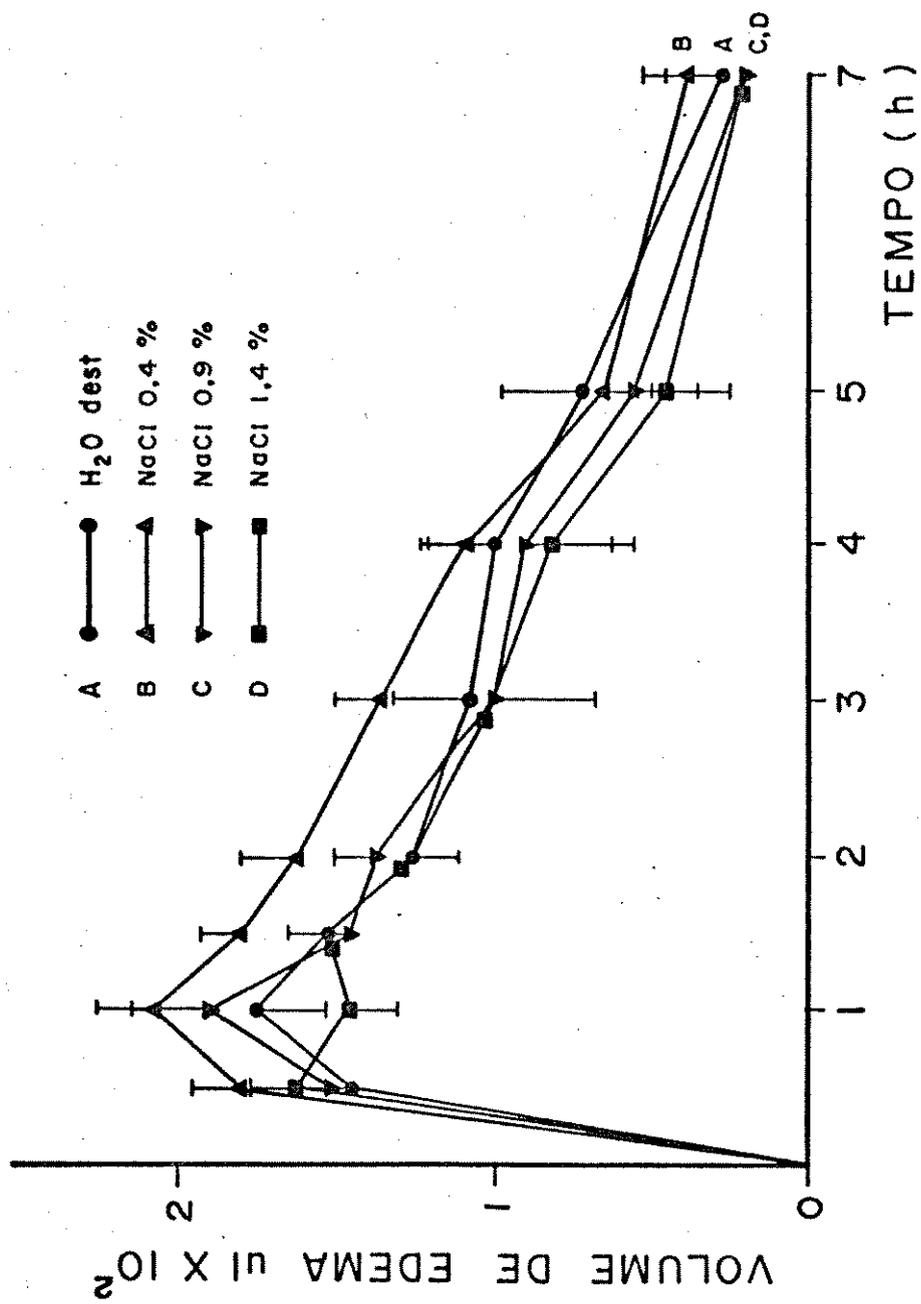


Fig. 09 - Efeito da aplicação subplantar de água destilada e de soluções de NaCl a 0.4%, 0.9% e 1.4%. Não são significantes as diferenças aparentes. Observar que a solução de NaCl a 1.4% está produzindo quase sempre a menor resposta.

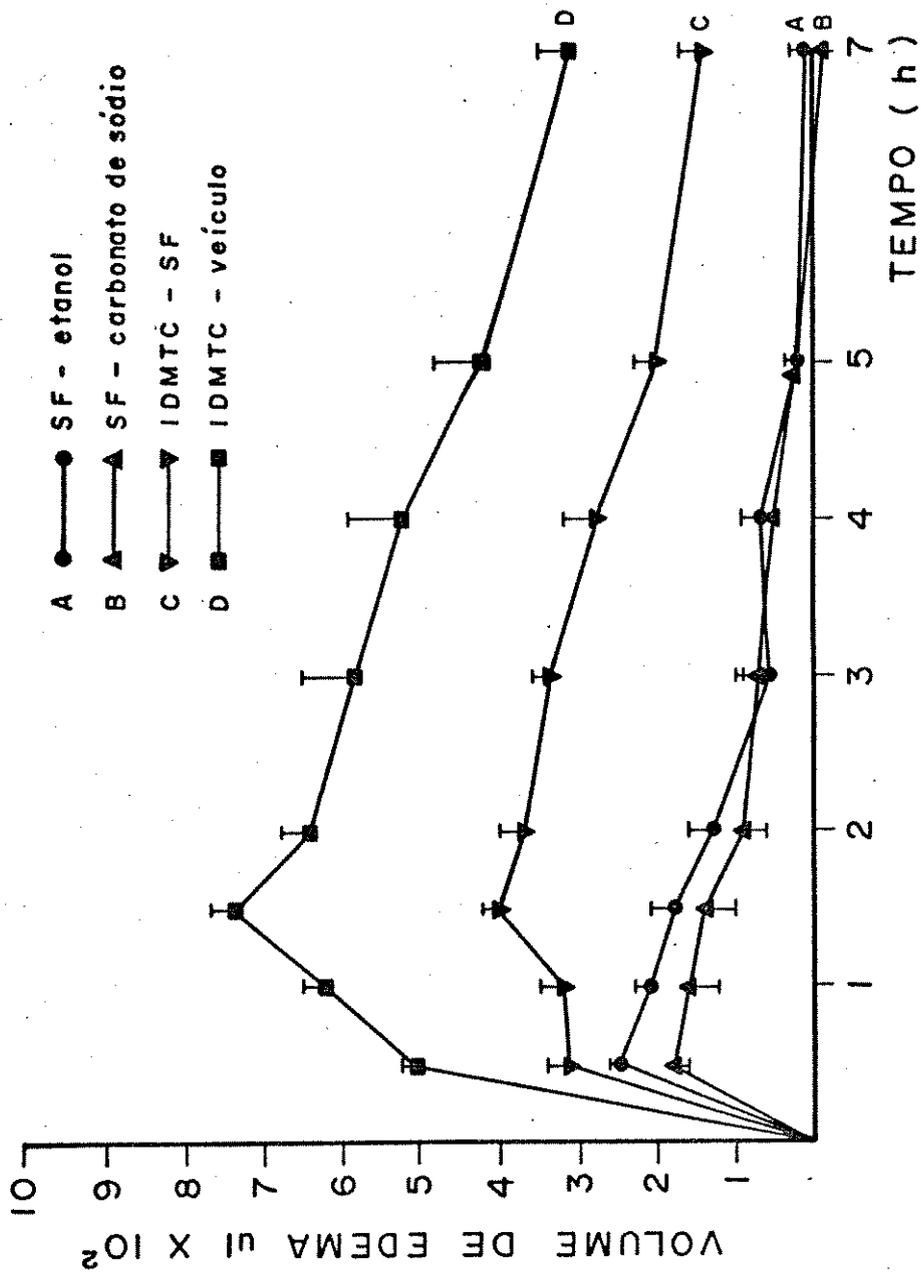


Fig. 10 - Efeito edemagênico da própria IDMTC e dos vários componentes de sua solução. Significância: A e B não diferem entre si mas diferem dos outros dois grupos. C e D diferem entre si.

Nossos resultados mostram que a administração subplantar do Tw20 simultaneamente em ambas patas de um mesmo animal, inibe drasticamente a resposta edematógena. No experimento ilustrado na figura 11 comparamos, entre si, patas direitas injetadas de cinco animais, com patas de outros cinco animais, que receberam aplicação bilateral, nas patas. Verifica-se que a inibição da resposta ocorre independentemente da natureza do solvente, água destilada ou soro fisiológico. Observa-se também que quando o solvente é água destilada, o edema é significativamente maior do que quando a droga é dissolvida em SF. Comparando-se os resultados da aplicação unilateral com a bilateral simultânea dos Tw 20 e 80, notamos (figura 12) que a aplicação bilateral simultânea destes Tw produz resposta significativamente menor do que quando aplicados em uma única pata, mesmo quando os Tw se encontram dissolvidos em água destilada.

A influência que uma reação inflamatória local à aplicação intraplantar de Tw 80 exerce sobre o desenvolvimento do edema originado por igual tratamento na pata oposta do mesmo animal é assunto do nosso maior interesse. Também estudamos se um grupo de animais é tratado pelo Tw 20 pela via subplantar e nas patas contra-laterais pelo Tw 80, como evoluirão os edemas. A figura 13 nos aponta os resultados obtidos, bem como a resposta à aplicação exclusiva do solvente. Nesta mesma ordem de idéias a carrageenina provoca, quando injetada por via intra-peritoneal, uma significativa redução do edema de pata pelo Tw 80. Faz o mesmo quando injetada na para contra-lateral. Por sua vez o Tw 80 também promove redução significativa do edema produzido pela CRRG na pata de ratos (figura 14).

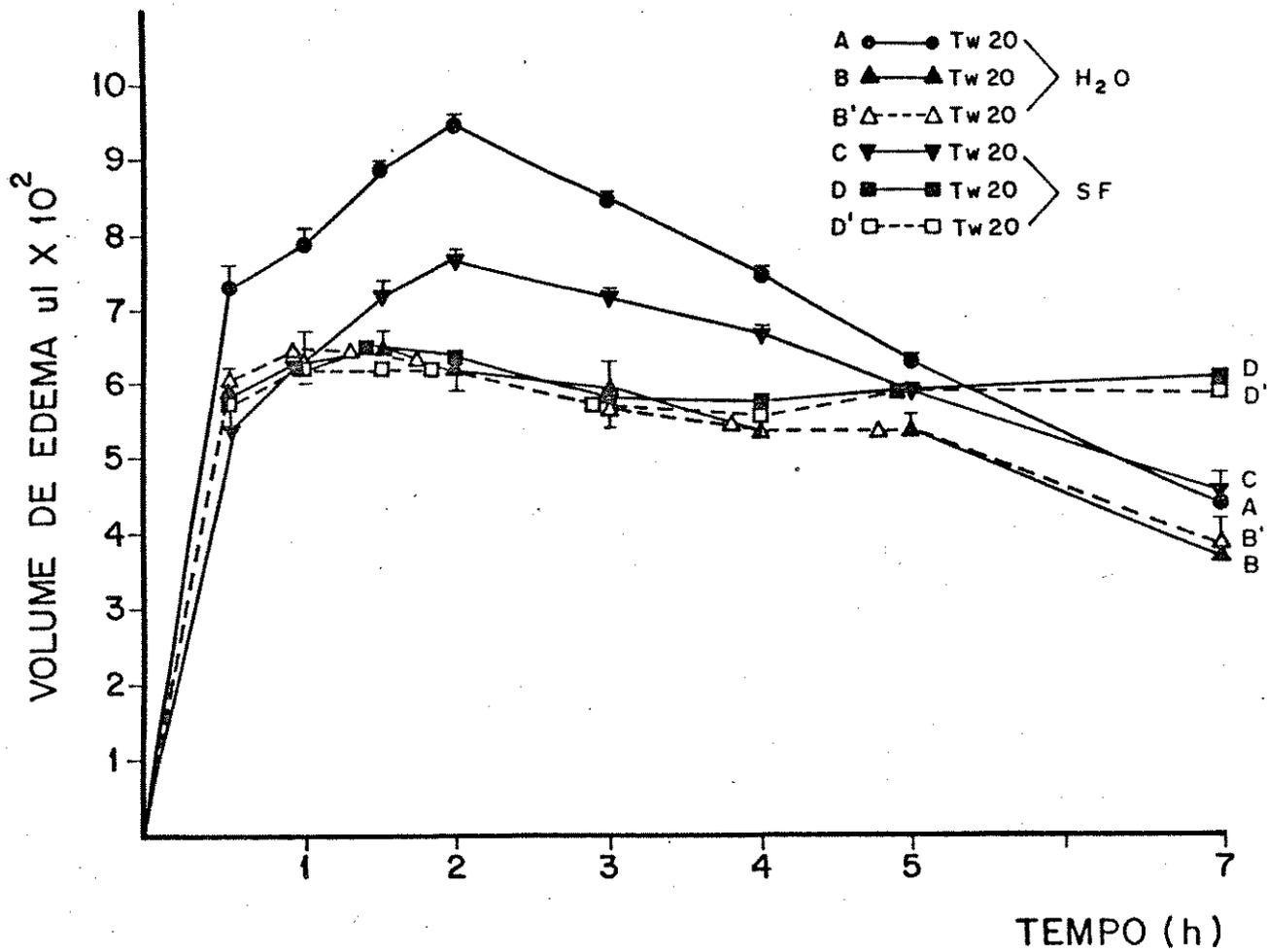


Fig. 11 - Efeito da aplicação simultânea unilateral ou bilateral de Tween 20 a 25% em SF ou água destilada. São significantes as diferenças: AxB, AxC, AxD, BxC e CxD.

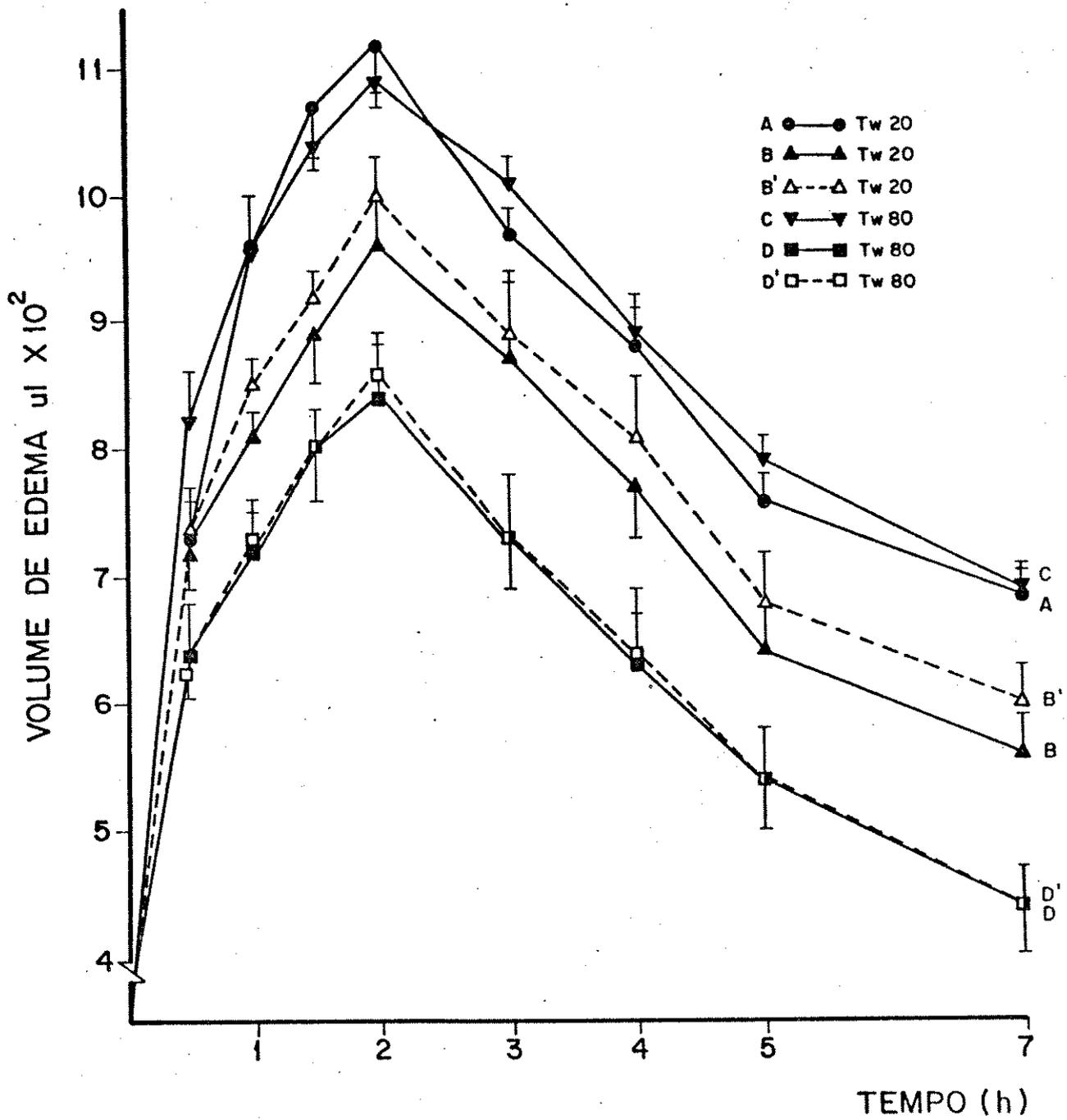


Fig. 12 - Efeito da aplicação unilateral ou bilateral simultânea de Tw 20 ou 80 a 20%, dissolvidos em SF. São significantes as diferenças: Ax B, CxD e CxD'.

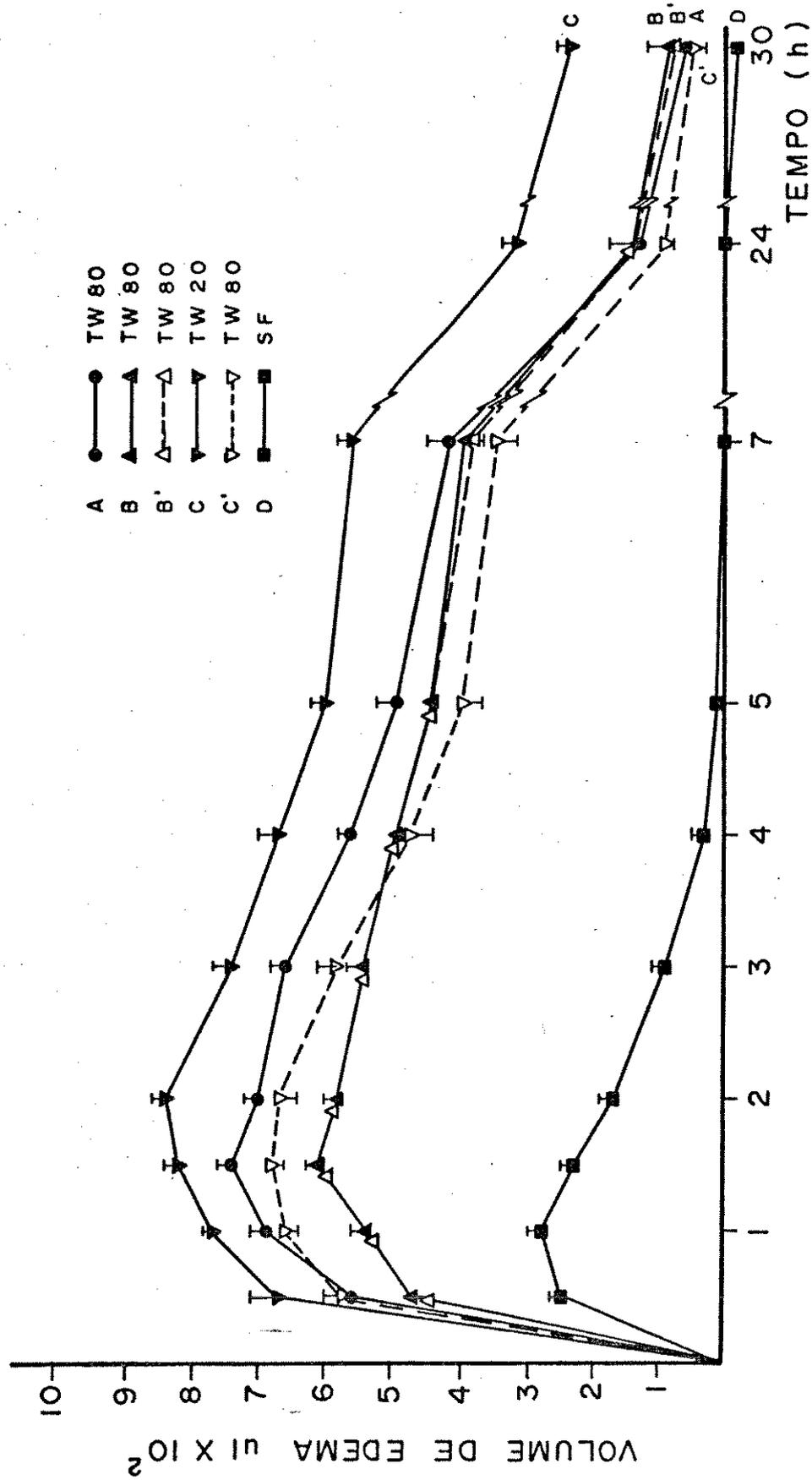


Fig. 13 - Efeito da aplicação unilateral ou bilateral de Tw 80 e aplicação bilateral dos Tw 80 a 25% e Tw 20 a 20% na pata. São significantes as diferenças: AxB, AxB', AxC, BxC, B'xC'.

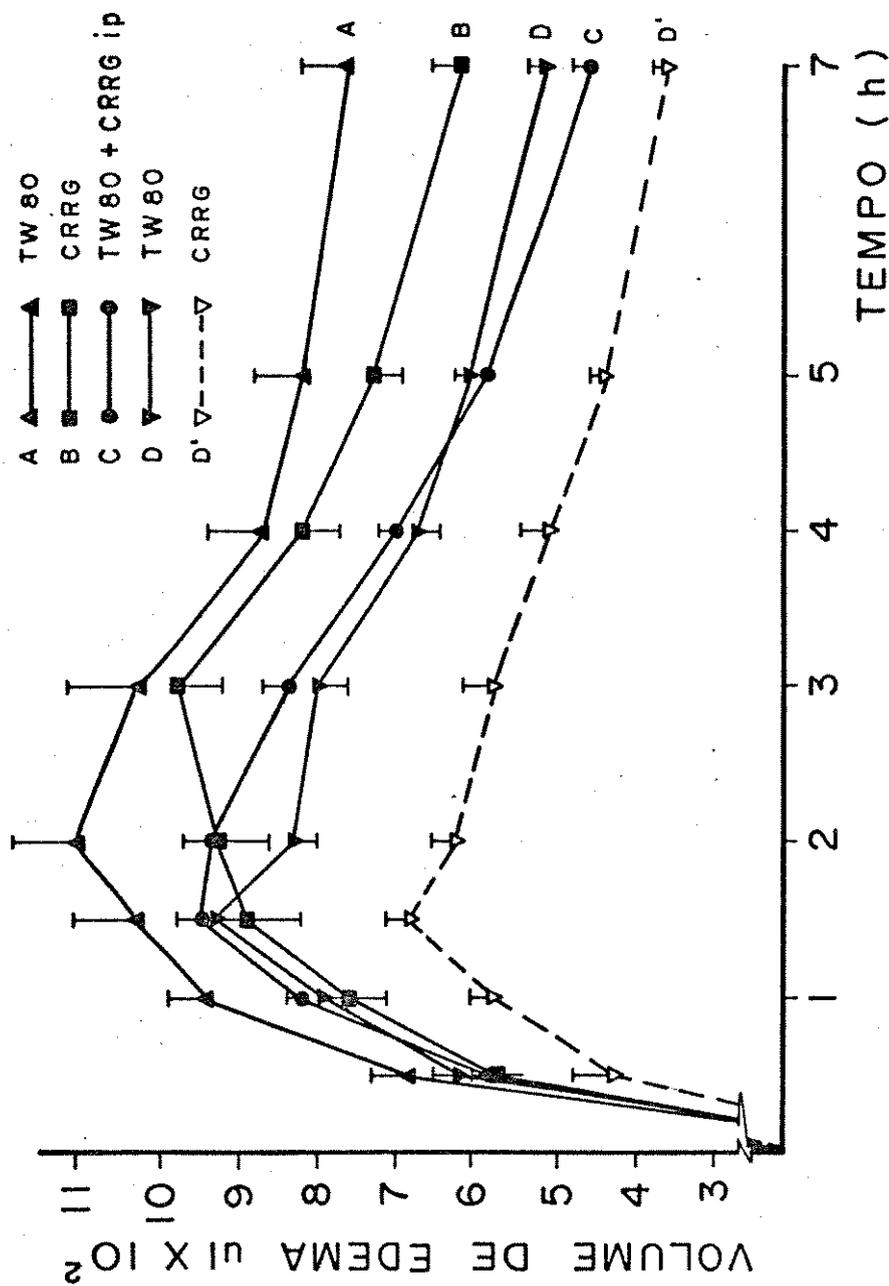


Fig. 14 - Efeito da administração simultânea de CRRG (sp. 500 ug ou i.p. 4,5 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre o edema produzido pelo Tw 80 e deste, sobre o edema pela CRRG. São significantes as diferenças: Ax C, Ax D e BxD'.

Para analisarmos o efeito da IDMTC sobre o edema produzido pelos Tw na pata de ratos, vários experimentos foram realizados: na dose utilizada, o anti-inflamatório não produz modificação significativa no edema provocado pelo Tw 40 a 25%, mas ocorre inibição parcial sobre a reação edemagênica, significativamente maior quando o Tw está a 50%, durante as 7 horas do experimento. É o que podemos observar pela figura 15. As respostas produzidas pelo Tw 40 a 25% e 50% são diferentes em cinco pontos, pondo em evidência a relação de dose-dependência. Queremos salientar que o Tw 40 a 50%, a partir da 3ª hora, modifica a resposta edemagênica fazendo novamente prevalecer a formação, sobre a reabsorção do edema, mesmo em presença do anti-inflamatório.

Podemos observar o efeito da IDMTC em duas diferentes doses, por via i.g., sobre as respostas provocadas pelo Tw 80 (figura 16). Também neste teste o anti-inflamatório não foi eficiente como antagonista. Já a IDMTC na dose de  $140 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , produz redução sistemática do edema produzido pelo Tw 40 a 50%, porém só significativa durante curto período de duas horas, enquanto que a inibição sobre o Tw 20 a 50% preenche nosso critério de significância estatística, como podemos observar pela figura 17. Também podemos notar que a partir da 4ª hora, volta a prevalecer a coleção de líquido no espaço extracelular sobre a reabsorção, nos ratos tratados com o Tw 40. Os exames sob lupa, dos estômagos destes animais revelaram hipermia, digestão da mucosa e áreas de necrose, particularmente na região glandular.

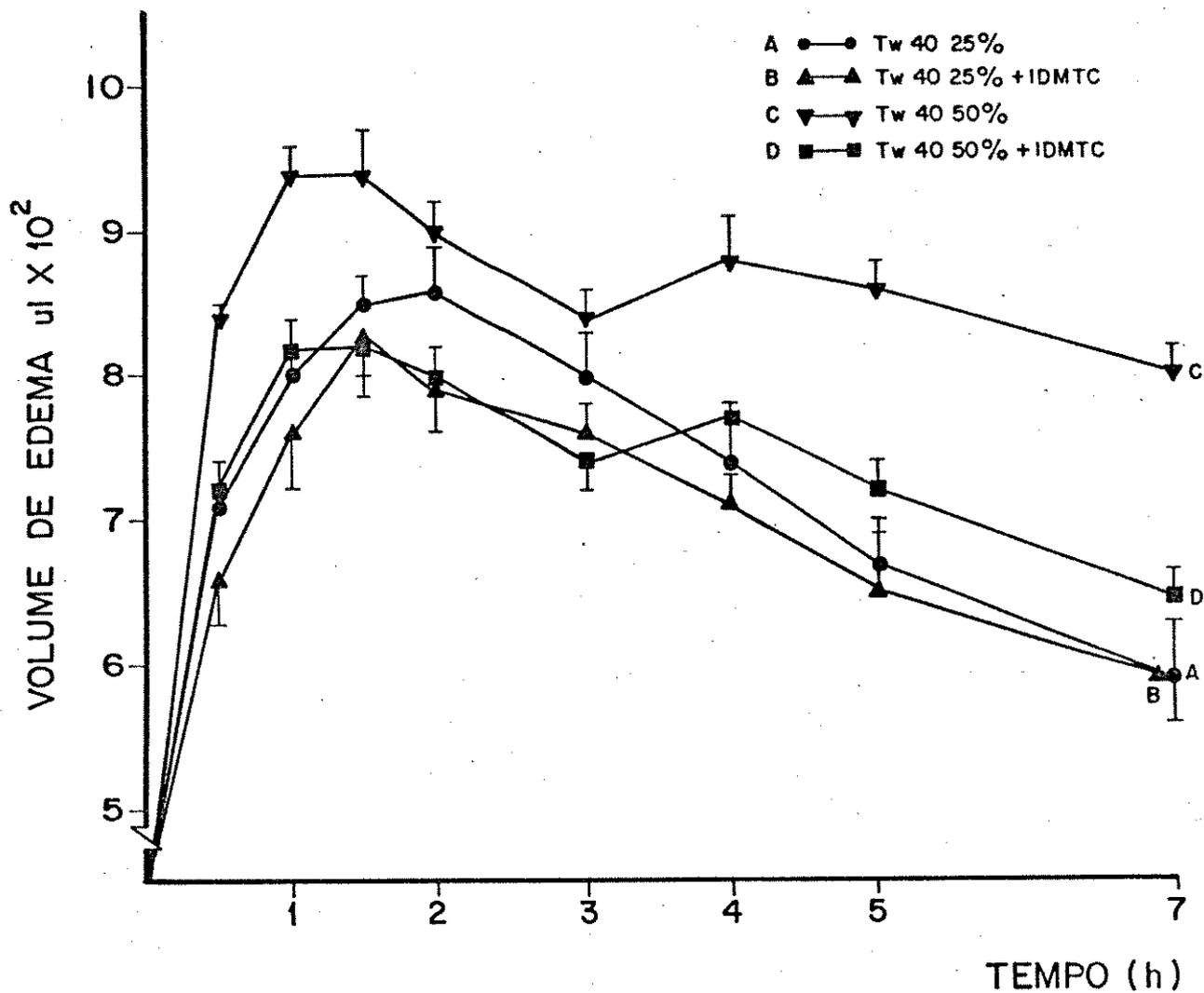


Fig. 15 - Efeito da indometacina (IDMTC)  $15 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.g.}$  sobre o edema produzido pelo Tw 40 a 25 e a 50%. São significantes as diferenças: AxC e CxD. Aplicação de IDMTC no tempo -1 hora.

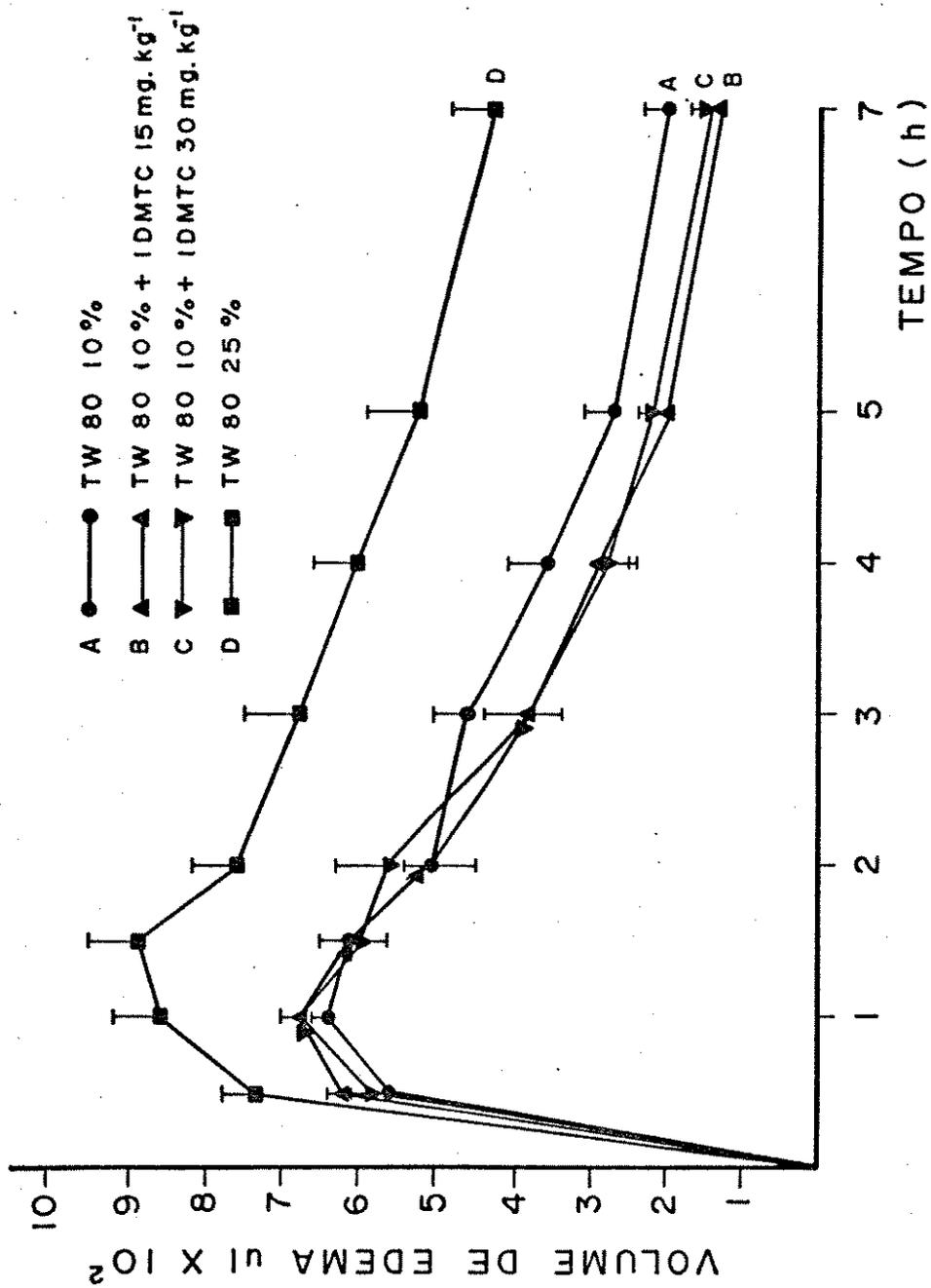


Fig. 16 - Efeito da IDMTC (15 ou 30 mg.Kg<sup>-1</sup>.g. no tempo -20 minutos) sobre o edema produzido pelo Tw 80 a 10%. Os edemas a 10 e a 25% diferem entre si mas a IDMTC não induz a bloqueio significativo.

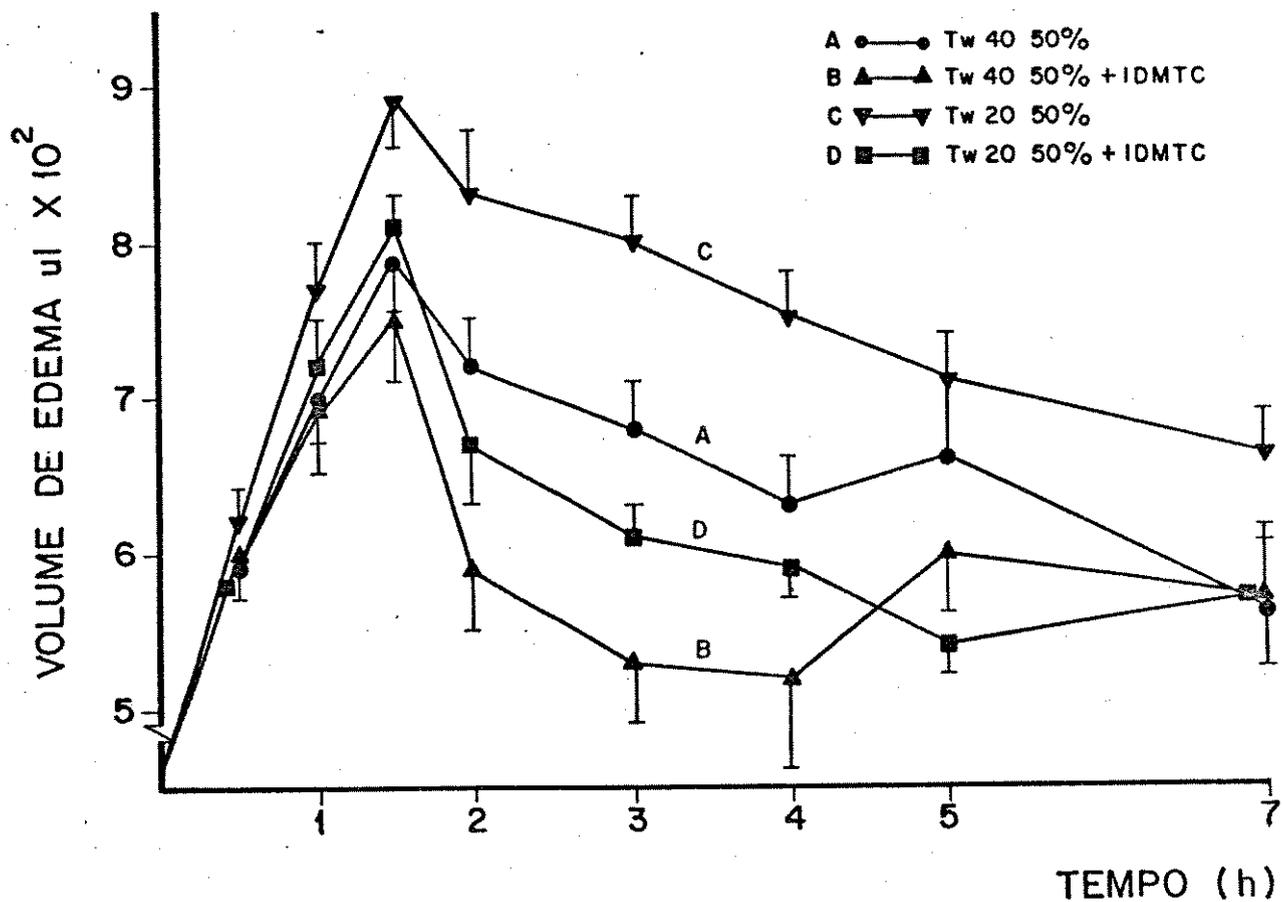


Fig. 17 - Efeito da IDMTC ( $140 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.g.}$ ) sobre o edema pelos Tweens 40 e 20 a 50% (sp). São significantes as diferenças: AxC e CxD.

Comparamos a potência edemagênica do Tw 80 de 2 procedências diferentes, M e R, na pata posterior de ratos (figura 18) e também o efeito da administração prévia de AAS sobre o edema produzido pelo Tw 80 M. Observamos que as respostas produzidas pelo mesmo polisorbato de 2 procedências são significativamente diferentes em todos os tempos de leitura. Apesar de não ser significativa no nível adotado, a aspirina produz pequena porém sistemática inibição da resposta produzida pelo Tw M. O efeito da administração intra-gástrica do complexo aspirina-lisina (AAS-lis) em 2 doses diferentes foi analisado, sobre o edema produzido pelo Tw 80 a 25% (figura 19). A capacidade inibitória da AAS na dose de 70 mg por quilograma sobre a resposta edematógena produzida pelo Tw 80 tanto a 10% como a 25% é mostrada na figura 20. Está claro que o anti-inflamatório produziu uma redução significativa da reação edematógena do Tw 80 a 25% reduzindo sua resposta a valores semelhantes aos produzidos pelo mesmo polisorbato, porém a 10%.

Nos experimentos representados pelas figuras 21 e 22 foi analisada a ação da AAS sobre a resposta inflamatória produzida pelo Tw 40 em duas concentrações diferentes, injetado na pata posterior de ratos. Nota-se que o anti-inflamatório produz inibição significativa do edema provocado pelo Tw 40 a 10% mas não modifica a resposta produzida pelo mesmo a 25%. Ao contrário, podemos observar que a mesma dose de AAS inibe o edema pelo Tw 40 a 40%, mas não modifica a resposta pelo mesmo a 10%. Observe que as respostas produzidas pelo Tw 40 nas diferentes concentrações mostram uma relação de dose-dependência. A mesma discrepância na relação dose-efeito do inibidor foi comprovada numerosas vezes, incluindo experimentos com

o Tw 80 que a 40% produz resposta inflamatória significativamente inibida pela aspirina mas, quando feita pelo mesmo Tw a 10%, não se mostra sensível à inibição pela mesma concentração do AINE. Nada menos que onze experimentos perfazendo 110 determinações confirmaram a ausência de efeito da aspirina sobre o edema inflamatório provocado por um dos polisorbatos estudados.

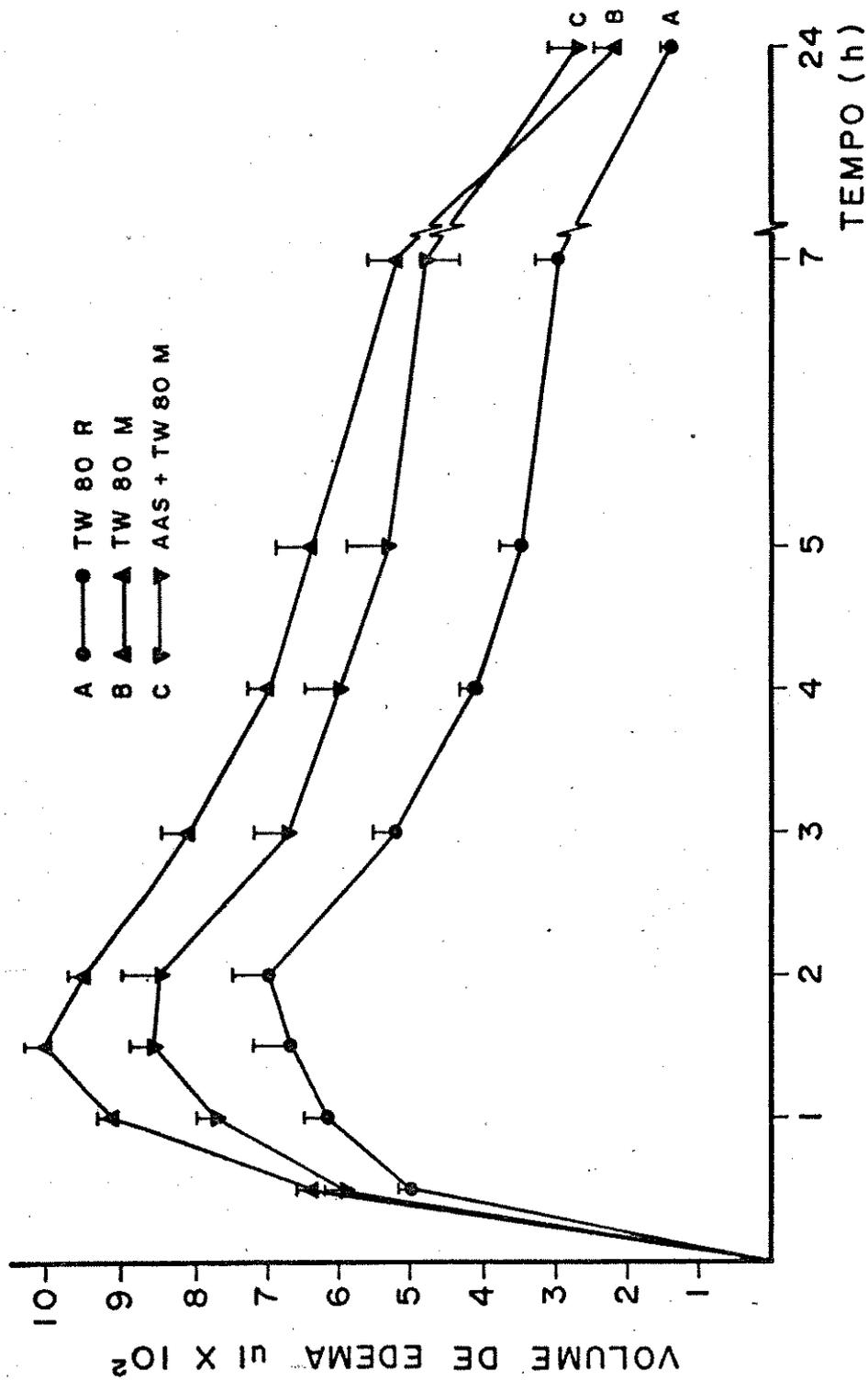


Fig. 18 - Produção de edema por duas amostras de Tw 80 (25%) de diferentes procedências e ação da aspirina (57 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre um desses Tw. É significante somente a diferença AxB.

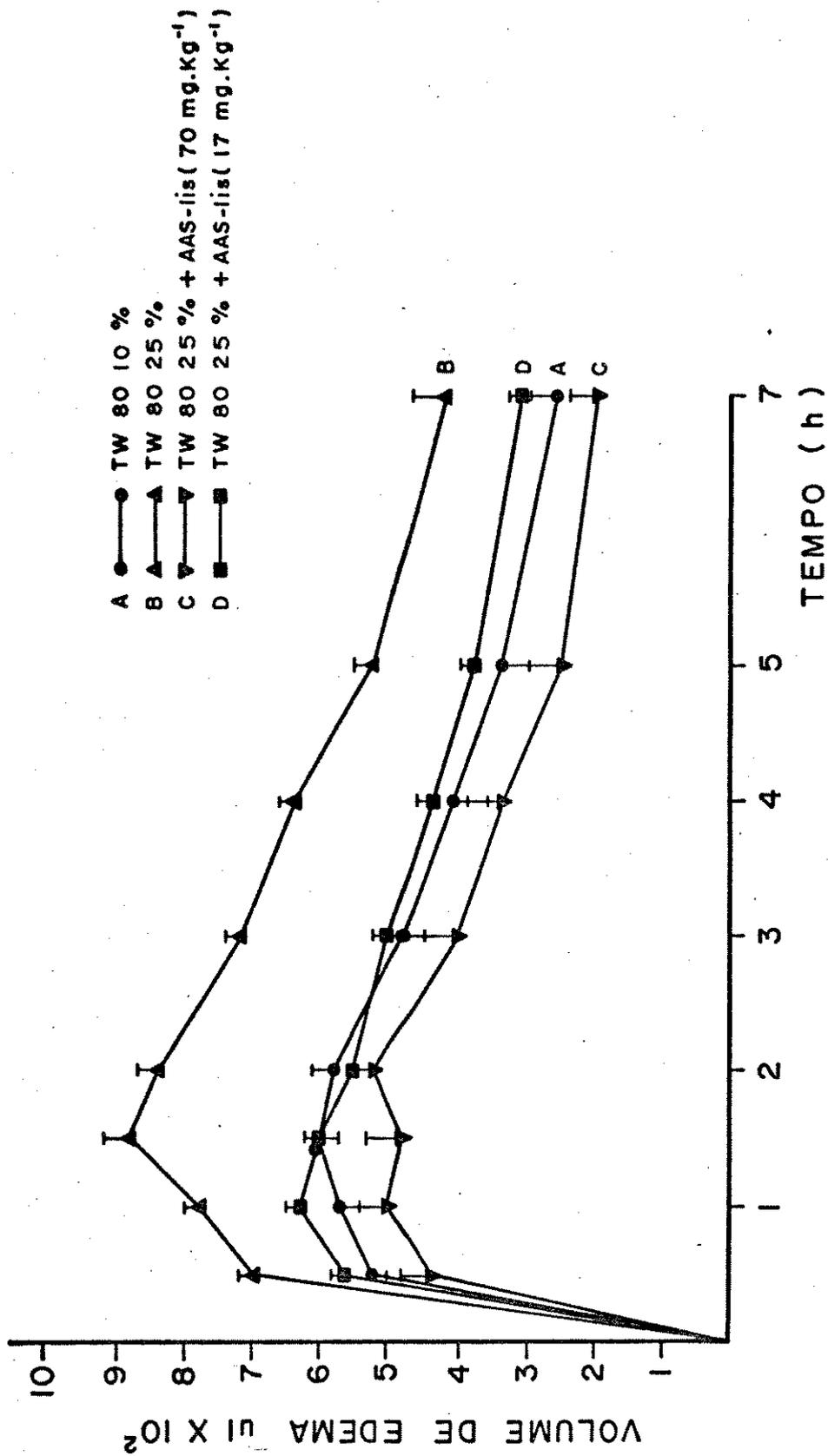


Fig. 19 - Efeito da AAS-lis. (17 ou 70 mg.Kg<sup>-1</sup>) sobre o edema produzido pelo Tw 80 a 25%. São significantes as diferenças: AxB, BxC, BxD e CxD. AAS aplicada no tempo -20 minutos.

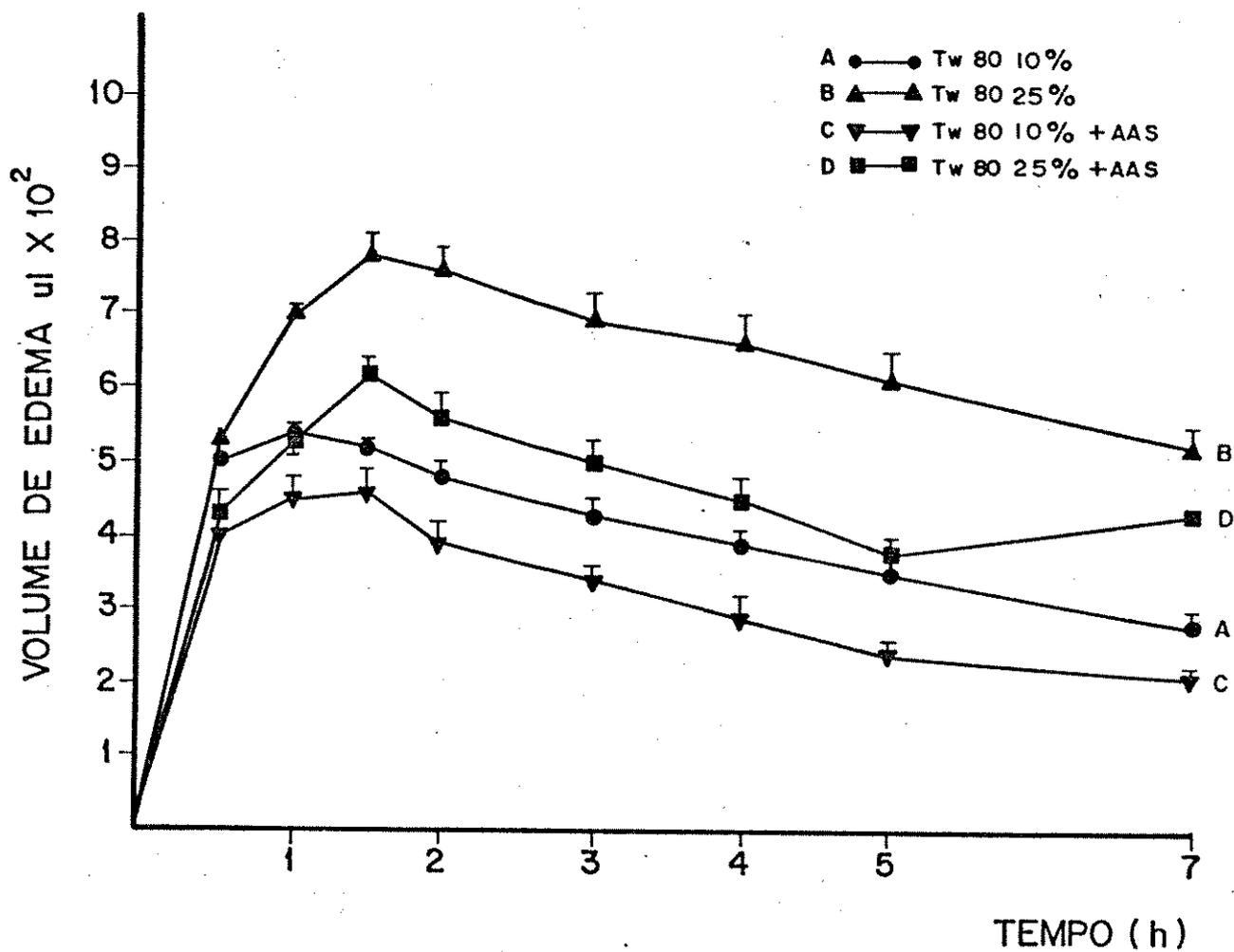


Fig. 20 - Efeito da AAS ( $70 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) sobre o edema produzido pelo Tw 80 a 10 e a 25%. São significantes as diferenças: AxB, AxC e BxD. AAS aplicada no tempo -20 minutos.

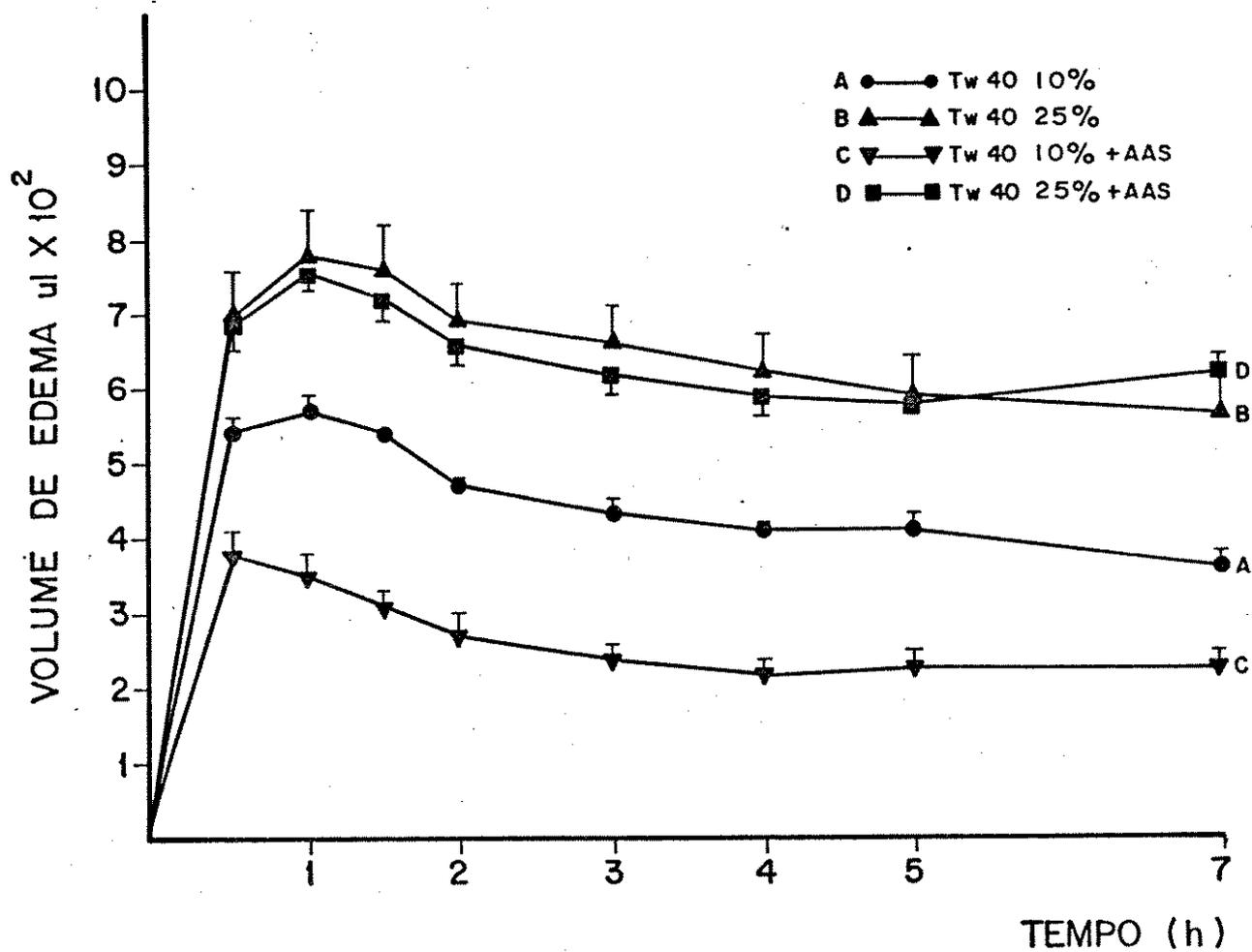


Fig. 21 - Efeito da AAS ( $70 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) sobre o edema produzido pelo Tw 40 a 10% e a 25%. São significantes as diferenças: AxB e AxC. AAS aplicada no tempo -1/2 hora.

Avaliamos também o efeito da AAS a 70 ou 100 mg.Kg<sup>-1</sup> sobre o edema pelo Tw 60 no experimento representado pela figura 23. As leituras foram feitas até 30 horas depois da aplicação do agente flogógeno. Observa-se, neste caso, que por volta da 7ª hora volta a prevalescer a coleção de líquido extracelular sobre a reabsorção do edema que atinge volume superior ao que ocorreu no horário de pico. São significantes as diferenças entre o grupo controle e ambos grupos tratados pelo AINE o qual nas duas concentrações estudadas produziu inibição significativa do edema.

Para determinarmos se o efeito da AAS poderia decorrer de contra-irritação gástrica, estudamos o efeito de outras substâncias irritantes ácidas aplicadas previamente. Assim por exemplo o ácido salicílico bem como a aspirina (figura 24), na mesma dose (105 mg.Kg<sup>-1</sup>) não produziram redução significativa do edema pelo Tw 20. Mostramos também o efeito do ácido benzóico (AB) sobre o volume do edema produzido pelo Tw 80 a 25%. Só a diferença entre os grupos C e D foi significativa, mostrando que as modificações produzidas por AAS e AS foram diferentes entre si (figura 25).

Um miligrama de aspirina injetada por via subplantar também provoca a formação de edema como mostra o estudo comparativo feito com a indometacina (figura 26). Ao mesmo tempo mostramos que quando aplicados ao mesmo animal, simultaneamente, em ambas as patas, tanto a IDMTC como a AAS não solicitam respostas contra-irritativas.

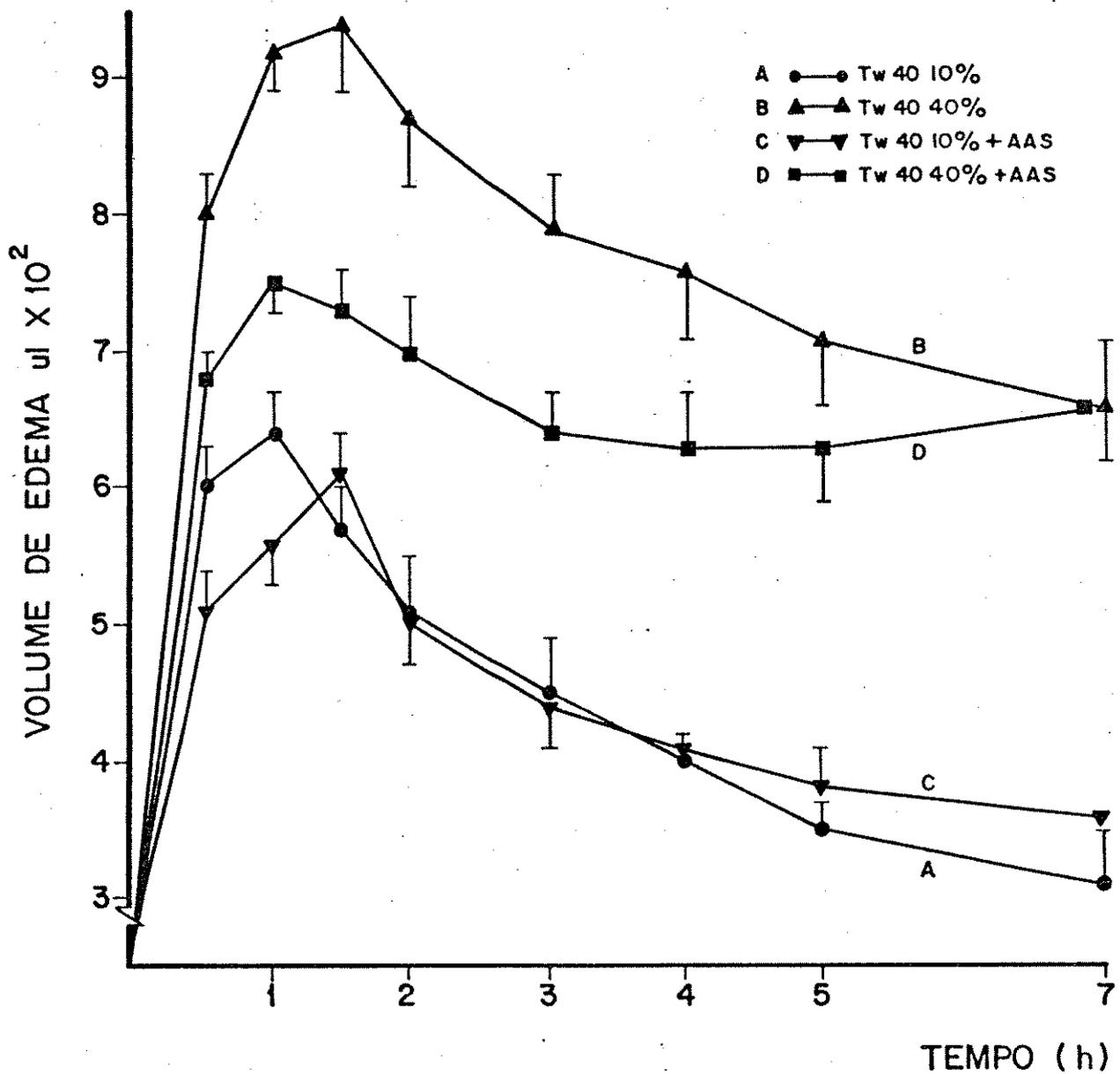


Fig. 22 - Efeito da AAS ( $70 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ i.g.}$  no tempo  $-1/2$  hora), sobre o volume de edema produzido pelo Tw 40 a 10% ou 40%. São significantes as diferenças: AxB e BxD.

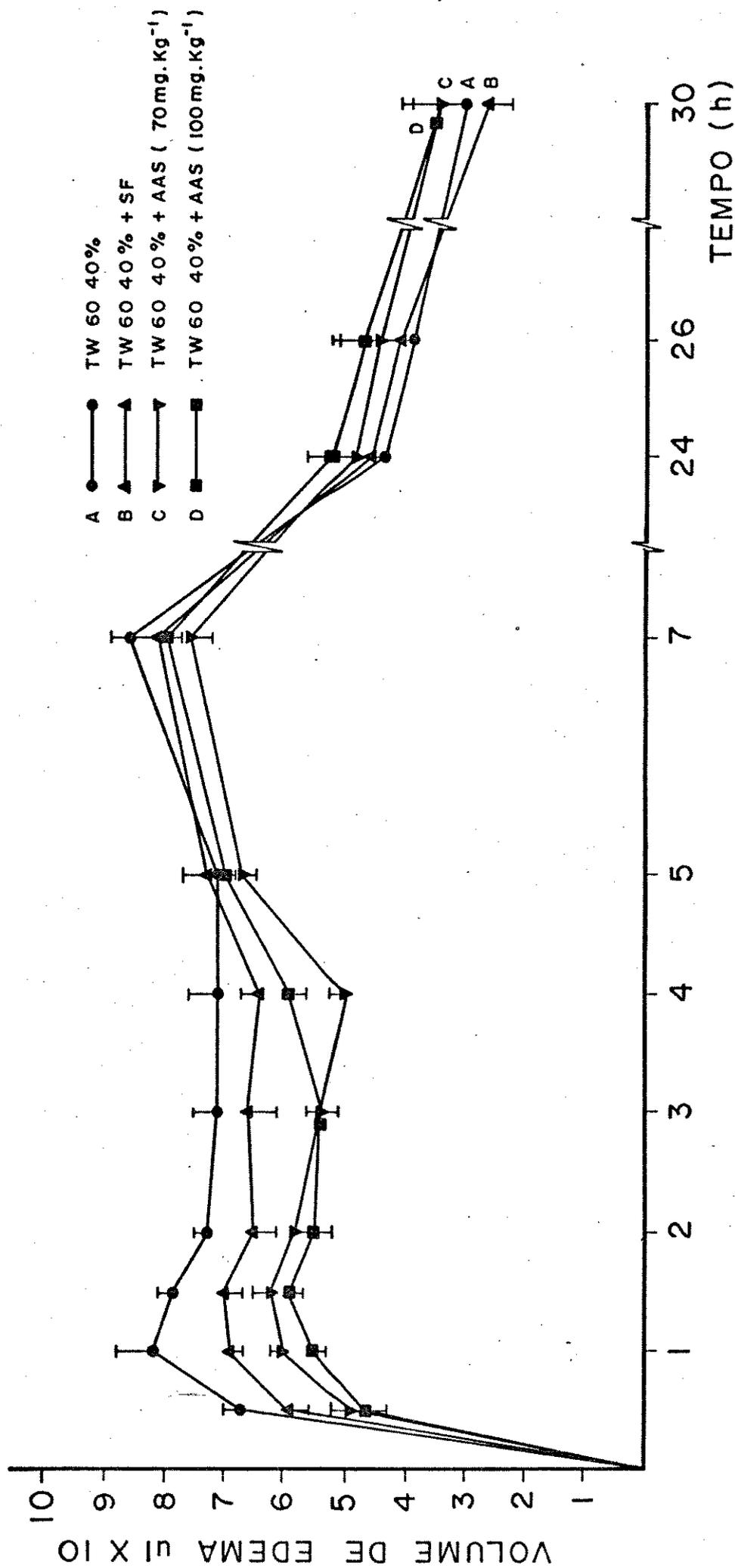


Fig. 23 - Efeito da AAS (70 ou 100 mg.Kg<sup>-1</sup>.i.g.) sobre o edema produzido pelo Tw 60 a 40%. São significantes as diferenças: Ax C e Ax D.

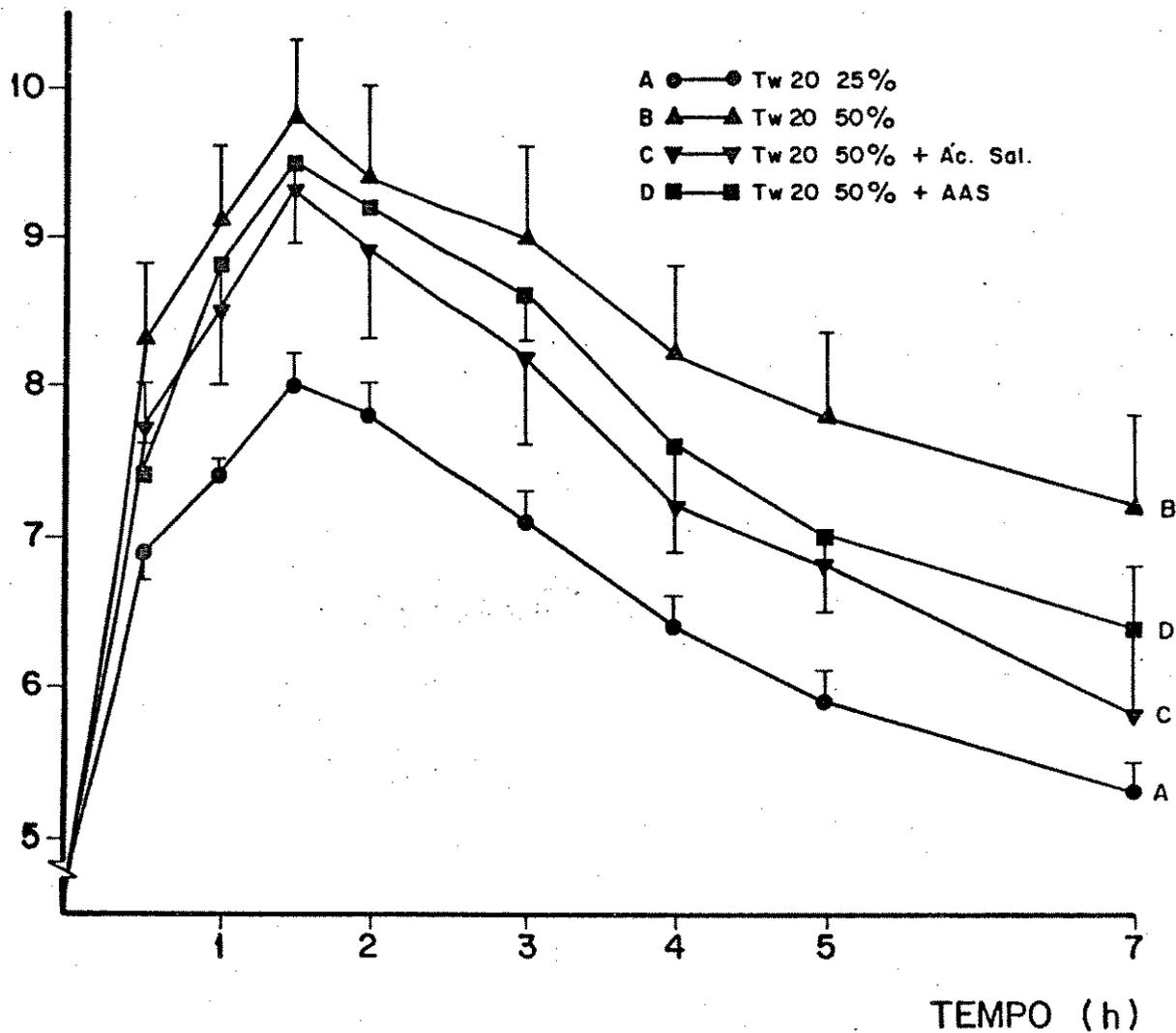


Fig. 24 - Efeito da AAS e do ácido salicílico (AS)  $105 \text{ mg.Kg}^{-1}$  aplicados 1 hora antes, sobre o edema produzido pelo Tw 20 a 50%. Tanto a AAS como o AS não produziram inibição significativa.

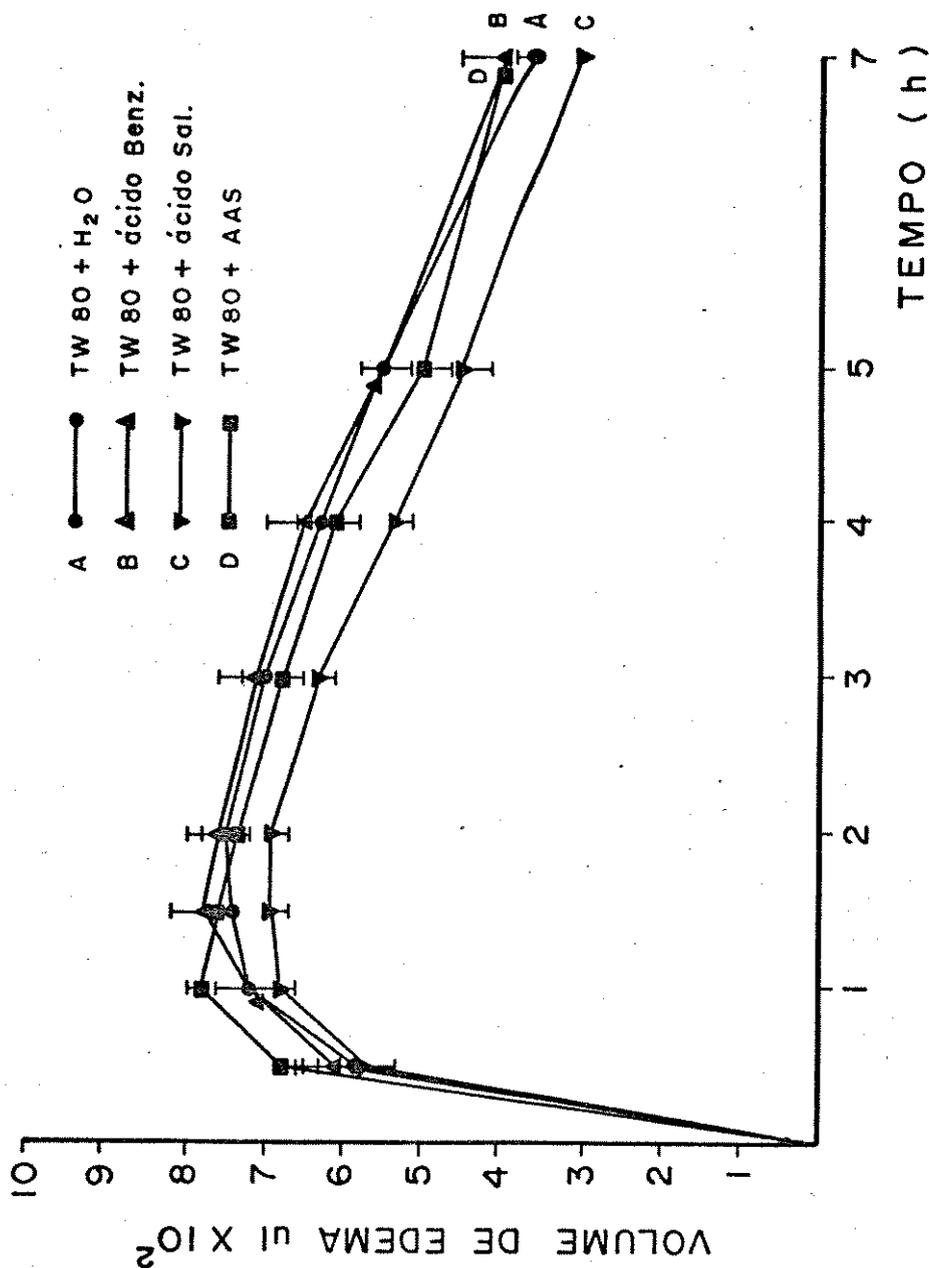


Fig. 25 - Efeito do ácido benzóico (AB), ácido salicílico (AS) e da aspirina (AAS) sobre o edema produzido pelo Tw 80 a 25%. A única diferença significante ocorre entre C e D.

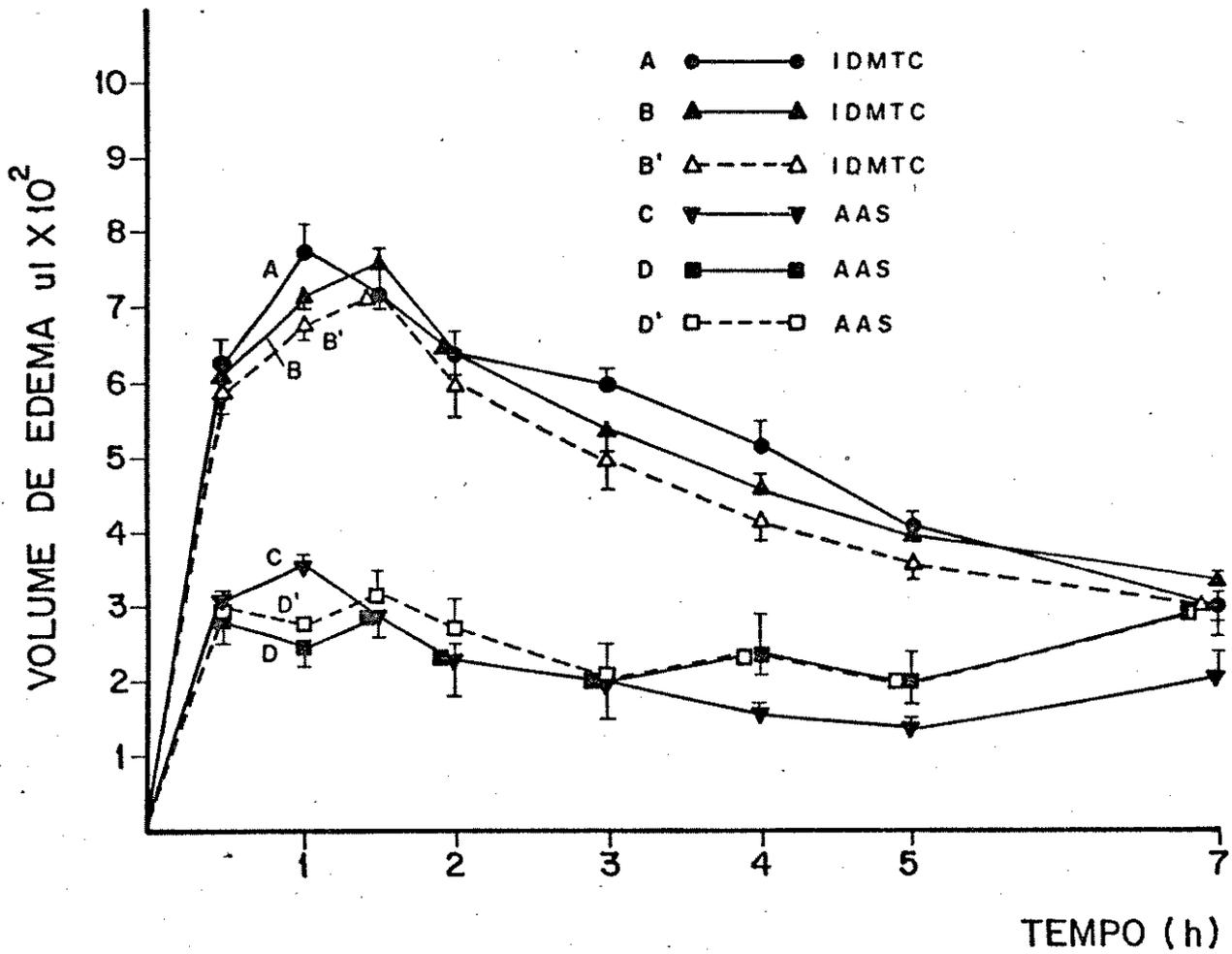


Fig. 26 - Evolução do edema produzido pela IDMTC ou pela AAS injetadas na pata posterior de ratos. São significantes as diferenças: Ax C e BxD.

O único glicocorticóide usado, a dexametazona, ao contrário dos resultados obtidos com anti-inflamatórios não esteróides (AINE) provoca, tanto a 20 como a 40 mg. Kg<sup>-1</sup>, forte inibição do edema produzido pelos polisorbatos, que é dose-dependente e que se mantém durante 7 horas ou mais, como podemos observar pela figura 27. Aos 30 minutos a pronunciada redução da resposta já pode ser observada para a dose maior. Podemos observar ainda a inibição dos edemas provocados pelo Tw 20 (figura 28) e pelo Tw 80 (figura 29).

Por serem os Tw muito viscosos, a preparação de suas soluções exige cuidados especiais, e às vezes até seu aquecimento brando. Com o objetivo de verificar se a elevação da temperatura por cerca de 10 minutos modifica a potência edemagênica dos polímeros, foram realizados experimentos como mostra a figura 28 analisando este efeito sobre a capacidade edemagênica do Tw 20 a 100%. Os líquidos foram aquecidos a 40, 60 e 80°C por minutos. Comparando-se o grupo A com B, C e D, verifica-se que quando aquecido a 40°C a sua resposta difere das demais a 60° e 80°C, enquanto que entre 60 e 80°C já não ocorre diferença entre as respostas. A DXMT administrada por via intra-gástrica 90 minutos antes da aplicação subplantar do Tw 20 produz forte e prolongada inibição desta resposta, durante mais que as 7 horas de leitura.

A resposta edemagênica dos grupos de animais adrenalectomizados 3 dias antes do teste com Tw 80 a 25% (sp), é sistematicamente maior que nos ratos submetidos a operação simulada. Nestes últimos, também não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. É o que podemos observar pela figura 29 a qual mostra ainda que o tratamento

dos animais adrenalectomizados pela DXMT 14 horas antes do experimento provoca forte inibição deste edema, o que já é visível aos 30 minutos de leitura.

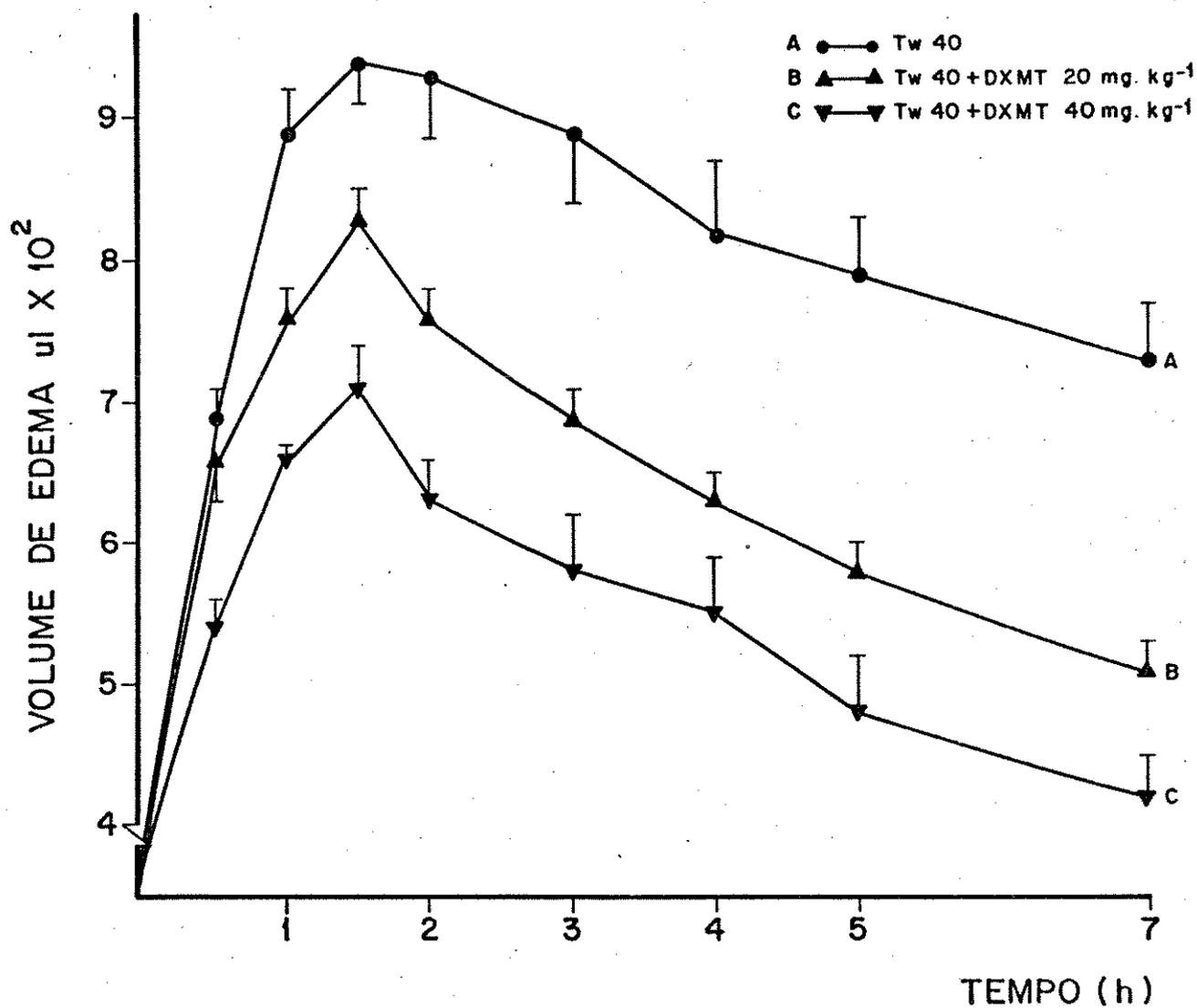


Fig. 27 - Efeito da dexametasona (DXMT) a 20 ou 40 mg.Kg<sup>-1</sup>i.g. sobre o edema produzido pelo Tw 40 a 40% (sp.) São significantes as diferenças: AxB, AxC e BxC. DXMT aplicada no tempo -1 hora.

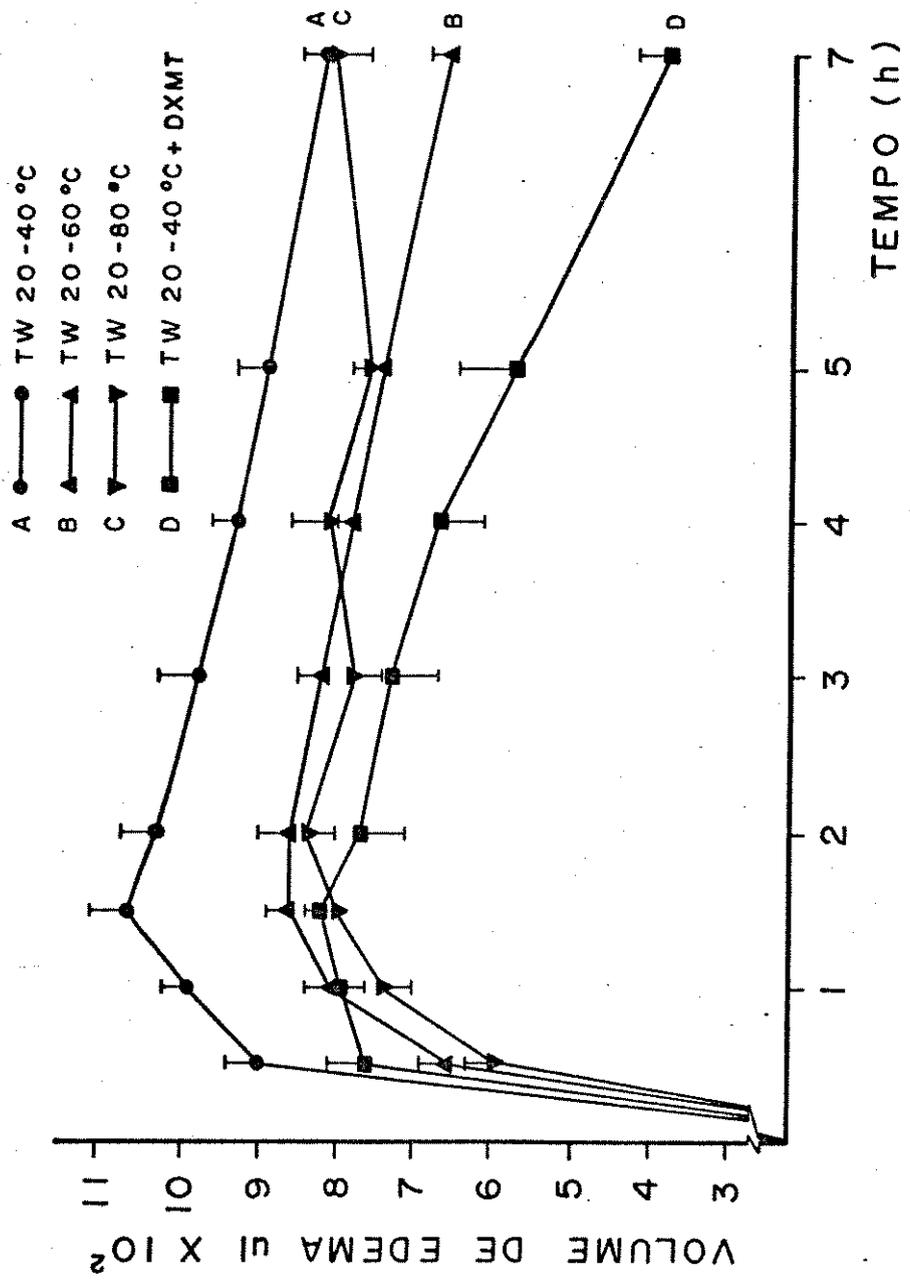


Fig. 28 - Efeito do pré-aquecimento do Tw 20 sobre o edema provocado pela sua aplicação subplantar a 100%. O efeito da DXMT (20 mg.Kg<sup>-1</sup>.g. no tempo -1 1/2 hora) também foi estudado. A duração do aquecimento foi estudado. A duração do aquecimento foi de 10 a 15 minutos, às temperaturas indicadas. São significantes as diferenças: AxB, AxC, AxD e CxD.

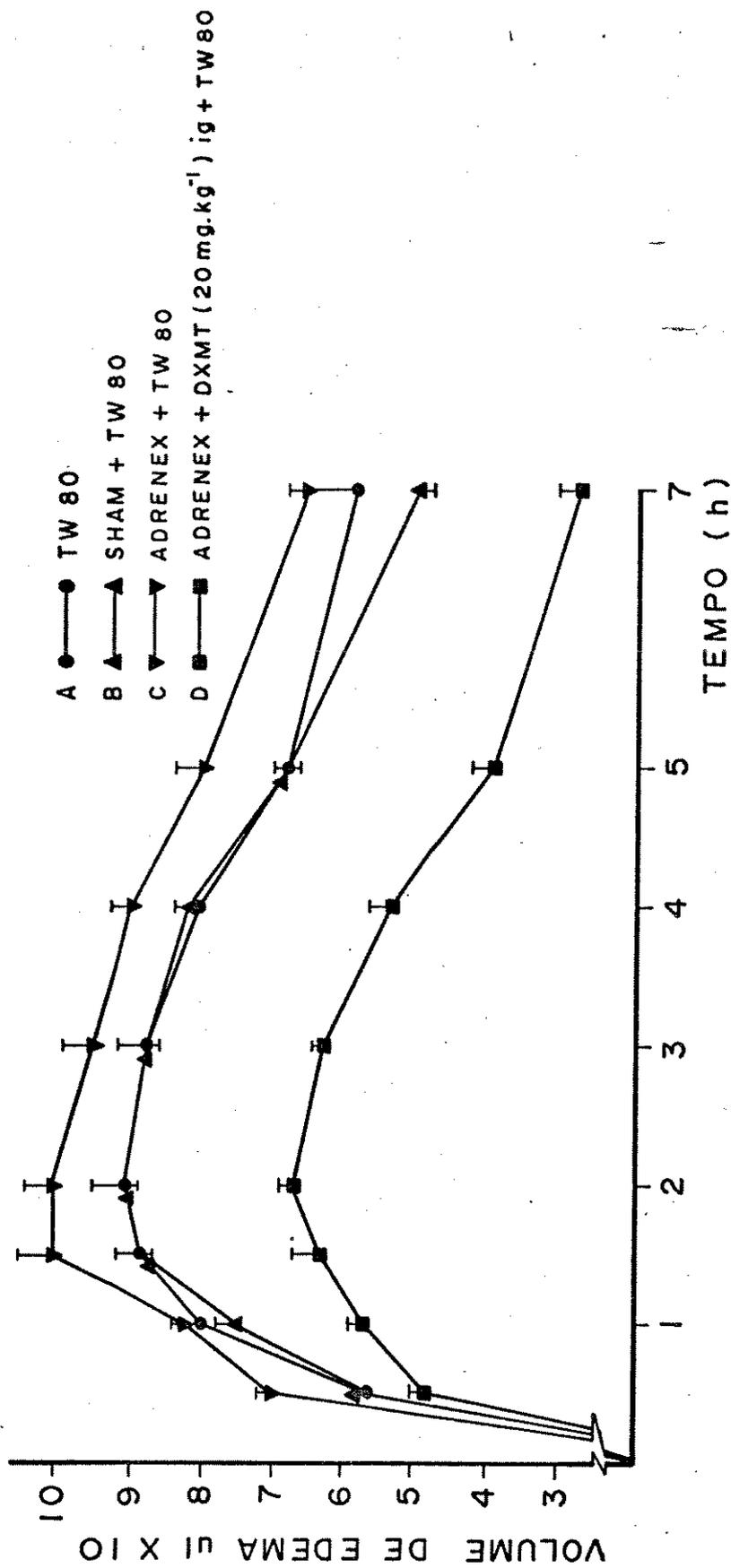


Fig. 29 - Efeito da adrenalectomia e da adrenalectomia + dextametazona (DXMT) 20 mg.Kg<sup>-1</sup>.g., sobre o edema produzido pelo Tw 80 a 25%. São significantes as diferenças: BxC e BxD (sham = operação simulada).

Para determinar se a resposta edemagênica pelos Tw possui algum componente dependente da liberação de histamina, estudamos, no experimento representado pela figura 30, o efeito da administração de terfenadina (TFND) em 2 doses, 2 ou 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, uma hora antes da aplicação do surfactante a 50%. Comparando-se os vários grupos, notamos que a inibição é dose-dependente e significativa em pelo menos 5 pontos entre A e B e A e C. Observamos com a dose de 10 mg.Kg<sup>-1</sup>, a TFND provoca inibição de quase 40% da resposta já na 2<sup>a</sup> hora de leitura.

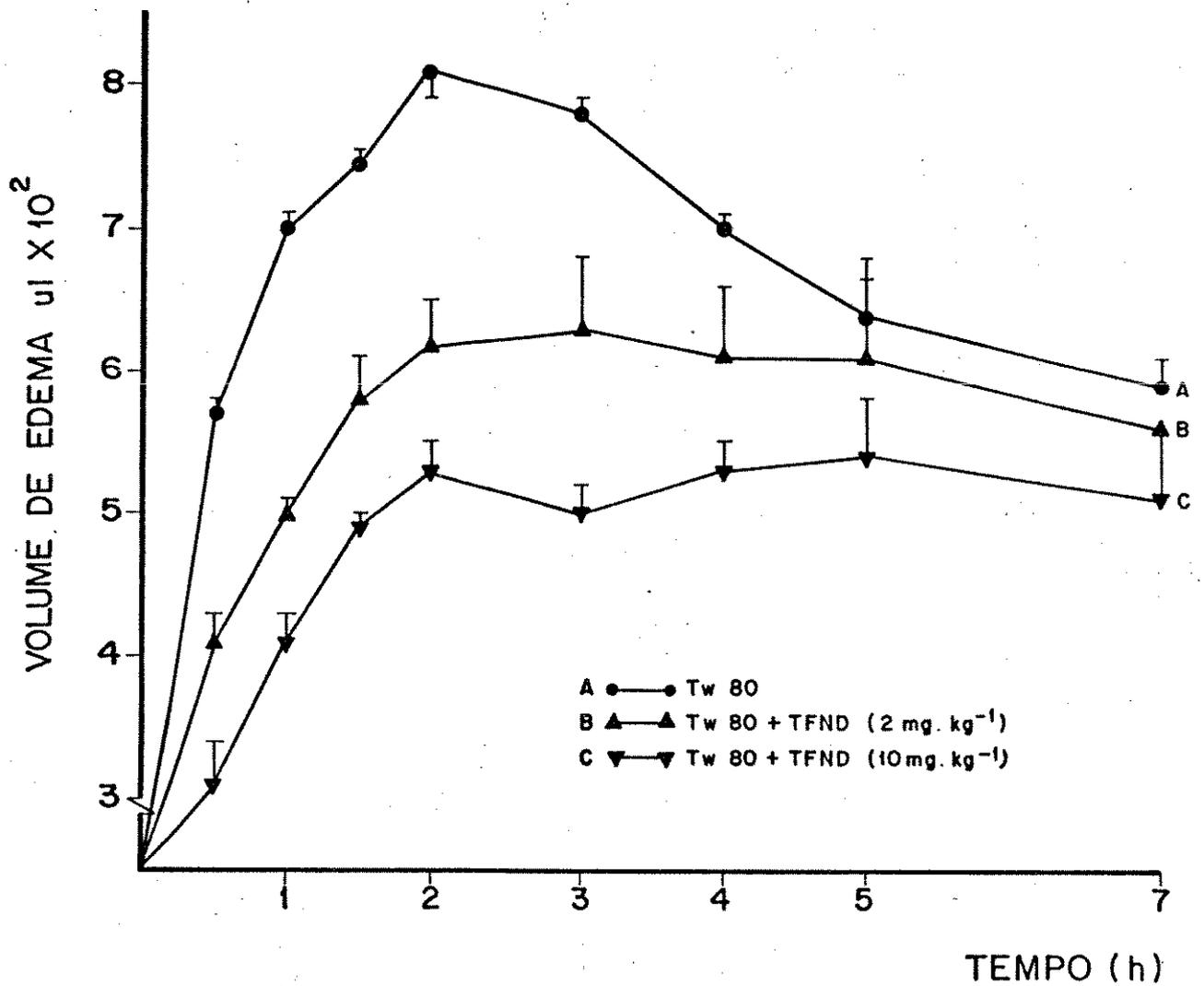


Fig. 30 - Efeito de Terfenadina (TFND) 2 ou 10 mg.Kg<sup>-1</sup>i.g. no tempo -1 hora, sobre o edema produzido pelo tw 80 a 50%. São significantes as diferenças: AxB, AxC e BxC.

## DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Como observamos numa visão global das figuras que representam as respostas edematógenas à aplicação intraplantar dos vários polisorbatos utilizados, as curvas mostram um padrão de desenvolvimento. Em torno desse padrão, com maiores ou menores afastamentos se situam as numerosas respostas registradas.

O padrão de curva que descreve o comportamento do edema inflamatório aos polisorbatos se inicia sempre com rápida ascensão desde o tempo zero até os trinta minutos, representada pela reta que interliga os pontos obtidos nas duas medições iniciais (figura 05).

Numa escala padrão onde em ordenadas cada centímetro corresponde a cem microlitros de edema e que em abscissas cada centímetro equivale a período de trinta minutos, a reta inicial tem grande inclinação que varia de pouco mais que 60 até cerca de 85 graus, e representa portanto a rápida evolução do edema nesse tempo, cuja representação gráfica convencionamos chamar de parte A da fase I. A esta, segue-se a parte B, ainda na primeira fase, iniciando-se aproximadamente aos 30 minutos e terminando ao atingir o volume máximo, isto é, no ponto de inflexão da curva, dando início ao segmento C descendente. Caracteristicamente B ainda é ascendente, porém de inclinação menor que A. Indica que o volume do edema continua a aumentar porém, a uma taxa menos elevada o que provavelmente significa que a edemagênese agora coexiste com processo de reabsor-

ção do líquido que converge para a região.

A fase 2 inicia-se aproximadamente na segunda hora e consta dos segmentos C e D sempre presentes e, eventualmente, do segmento E que se manifesta só em determinadas condições. O segmento C é a primeira etapa em que a reabsorção do edema predomina; tem curta duração uma vez que na maioria das vezes um novo fator se impõe retardando a reabsorção do líquido de edema. A linha D tem longa duração, porém limitamos arbitrariamente sua extensão até a 7ª hora, duração máxima da maioria dos experimentos. O segmento F que sucede a D na maioria dos experimentos não revelou particularidades e não foi estudado em detalhes, face a limitações impostas pela própria duração das medições. Finalmente o segmento E, que raramente é observado, descreve situação em que a linha descendente D inverte sua tendência, voltando a ser ascendente, indicando nova dominância do efluxo de líquido para o interstício, e termina em novo ponto de inflexão (figuras 15, 17).

É fácil imaginar a complexidade dos fatores celulares que provavelmente participam desses eventos e que estão ainda por ser estudados.

O Tw 80, em 3 concentrações muito próximas, 25, 27 e 30% evoca respostas iniciais praticamente iguais em relação ao volume máximo atingido em uma hora. Também a parte B não se acha bem diferenciada, embora os estímulos se mostrem diferentes, o que se deduz pela divergência das curvas a partir da segunda hora. Pode se observar claramente que apesar de produzirem inicialmente edemas iguais, a evolução é estritamente dose-dependente, havendo diferença significativa entre os edemas a 25% e 30%, isto é, o procedimento experimental permiti

te diferenciar as respostas a essas duas concentrações, situando-se a concentração intermediária de 27% aproximadamente no meio de ambas linhas, a partir da 4ª hora, embora sem significância estatística no nível proposto de 5%. Está claro também que a reabsorção, fase 2, é visivelmente proporcional ao estímulo, e não ao efeito (figura 6).

Podemos observar que quando a distância entre as doses é maior, como por exemplo 10, 25 ou 40% no experimento já descrito usando-se o Tw 60, as diferenças já são bem mais evidentes na primeira fase, na qual a parte A mostra inclinações menores para a concentração menor, e na parte B os valores máximos atingidos também se distanciam entre si. A segunda fase se inicia muito regularmente a partir de duas horas. Toda a parte C se caracteriza pela regularidade, mantendo-se até o final a mesma inclinação.

As concentrações das soluções por nós utilizadas foram escolhidas em testes preliminares, em função do volume de edema que provocam na pata de ratos. Nessas concentrações, muito acima da concentração micelar crítica (cmc), os surfactantes não-iônicos formam soluções micelares isotrópicas, com a ocorrência de cristais líquidos (HERRINGTON E SAHI, 1986). Quando a fase micelar é aquecida a certa temperatura crítica, algumas soluções podem se tornar subitamente turvas (ponto de névoa) quando então se separam duas fases. Depois de algum tempo as soluções turvas se tornam límpidas e se separam em dois líquidos isotrópicos, um com baixa concentração do surfactante não-iônico disperso (aproximadamente 0,02% em peso) e outra fase em que a água está dissolvida no surfactante (SHINODA, 1970; ZULAUF E COLS., 1983). Para limites relativamente amplos de

concentração pode não haver mudança do ponto de névoa, mas este é profundamente afetado pela adição de eletrólitos, alguns dos quais o elevam enquanto outros o diminuem (SCHOTT E ROYCE, 1986). Essas propriedades físicas variam de substância para substância e, portanto, entre os polisorbatos utilizados. Além disso, a temperatura impõe sobre a flogogenicidade uma outra variação que registramos (figura 28), a qual não está relacionada com essas complexas interações micela-micela e micela-solvente uma vez que ocorrem no produto "in natura", ou seja em ausência de qualquer solvente. Essas considerações são importantes, uma vez que, ao longo do ano, com pequena variação de temperatura ambiente, fomos obrigados a padronizar as condições de preparo das soluções de Tween a serem injetadas, o que exigia aquecimento e pequena agitação para atingirem a homogeneidade. Ainda assim é impossível responder qual o significado ou até que ponto esses fatores contribuem para a variabilidade das respostas biológicas obtidas experimentalmente.

Variações da intensidade reacional por conta dos animais de experimentação são complexas, como se pode depreender das respostas nos testes de contra-irritação, lembrando a possibilidade da existência eventual de processos inflamatórios internos inaparentes, principalmente pulmonares.

Sabe-se que os polisorbatos sofrem auto-oxidação quando suas soluções aquosas são estocadas, ocorrendo, no caso do Tw 20 e provavelmente nos demais, oscilação do número de peroxidação, aumento da acidez, queda da tensão superficial, até estabilização em novos valores. Há também queda brusca do ponto de névoa, de modo que a turbidez se manifesta já à temperatura ambiente. Esse processo é acelerado pela luz, pela

elevação da temperatura e pela presença de traços de certos metais, ocorrendo hidrólise do produto, com liberação do ácido graxo e encurtamento da cadeia polioxietilênica quando se ultrapassam os 40°C (DONBROW E COLS., 1978). Nossas soluções aquosas foram, conforme descrevemos, preparadas poucos minutos antes da administração ou das determinações físico-químicas. Entretanto os mesmos autores descrevem amostras com evidência de degradação química nas embalagens originais, ainda não previamente abertas. Para analisar até que ponto esses fatores respondem pela variabilidade das respostas biológicas o teste biológico mais utilizado para os polisorbatos deve ser o da hemólise "in vitro", no qual a lesão sobre a membrana das hemácias é atribuída com frequência à peroxidação de ácidos graxos insaturados. Sabe-se que a formação de peróxidos por auto-oxidação de surfactantes polioxietilênicos é componente significativo na hemólise provocada por essas substâncias. AZAZ E COLS. afirmaram que a diversidade da potência hemolítica não deve surpreender, uma vez que a susceptibilidade de certa preparação comercial à auto-oxidação também depende de vários fatores que fogem do controle, como sejam, idade do produto, condições de estocagem, características da embalagem, bem como a origem da matéria-prima usada na síntese do composto (AZAZ E COLS., 1981).

O comportamento anômalo da viscosidade de compostos etoxilados com o aumento de sua diluição é bem conhecido e documentado, bem como as variações impostas por mudanças de temperatura das soluções aquosas. A concordância entre resultados experimentais e previsões teóricas baseadas na estrutura, confirma o conceito de que os adutos estão presentes

sob a forma hidratada quando em solução aquosa e que a hidratação desses adutos é processo exotérmico. Essa é a provável razão pela qual as forças de associação dos grupos hidrofóbicos ficam mais eficazes resultando em agregados maiores. A queda subsequente de viscosidade após atingir seu valor máximo decorre da formação de duas fases, (SCHÖNFELDT, 1969).

A presença de sais inorgânicos provoca efeito desidratante nas soluções a 50-70% dificultando a formação de géis. A adição desses sais à soluções mais diluídas pode causar aumento da viscosidade. A retirada de água de hidratação da macromolécula leva à interações mais fortes.

A adição de eletrólitos à solução de surfactantes não-iônicos modifica a temperatura conhecida como ponto de névoa, isto é, a temperatura em que ocorre separação de fases. Isto ocorre por causa da dissolução do eletrólito no solvente do sistema, alterando o ambiente intermicelar. O comportamento do NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, LiCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, LiSO<sub>4</sub> dentre outros, é semelhante, existindo variações apenas quantitativas, demonstrando que é o aumento da força iônica que faz baixar o ponto de névoa (SHINODA, 1970). Os pontos de névoa independem da concentração do surfactante entre limites relativamente amplos mas são fortemente afetados por eletrólitos, alguns dos quais elevam a temperatura até a qual o surfactante é solúvel em água "salting in" enquanto que outros fazem baixar o ponto de névoa ou seja impõe limitação à solubilidade atingindo eventualmente ponto de "salting out". Tanto o cátion Na<sup>+</sup> favorece o "salting out" como também o ânion Cl<sup>-</sup> (SCHOTT E ROYCE, 1986).

Podemos observar que a presença do eletró

lito na solução do polisorbato impõe alterações físico-químicas que se traduzem biologicamente por modificação do edema inflamatório. Assim o Tw 20 (figura 11) quando a 30% em água, produz reação tecidual significativamente maior que quando diluído em SF. Também o fenômeno da contra-irritação, que ocorre tanto na presença como na ausência do NaCl no solvente, é afetado, mostrando diferença significativa de comportamento a partir da 5ª hora. Assim, a mesma solução com ou sem eletrólito aplicada unilateralmente (grupos A e C) ou bilateralmente (D e B), permite afirmar que também a CRRG sofre efeito contra-irritante do Tw 80 (linha C) como, além disso, impõe contra-irritação sobre o efeito desse mesmo polisorbato (linhas A e D figura 14).

Nossos resultados mostram com clareza que a contra-irritação é fenômeno operativo em relação aos polisorbato os quais não apenas provocam inibição como também são inibidos pelos mesmos (Tw) ou por outras substâncias como, por exemplo, a carrageenina (figuras 11, 12, 13, 14). Um dos principais obstáculos para se compreender os mecanismos, implícitos no processo contra-irritativo está na própria natureza complexa dos processos inflamatórios, sempre multifatoriais, com componentes endógenos que às vezes se sucedem, às vezes se superpõem e frequentemente se interagem. Nem por isso o processo deixou de ser reconhecido como importante. Já em 1895 GILLIES, citado por BONTA (1978), publicou o primeiro trabalho de valor científico sobre a contra-irritação. Reconhece-se que a espécie química irritante, a via e o local da aplicação, bem como a espécie animal, são fatores da maior importância na reprodução do fenômeno. É possível não só prevenir, como também provocar

redução na severidade de alguns processos inflamatórios já em franco desenvolvimento (VINEGAR E TRUAX, 1970).

A importância de se obterem dados sobre a contra-irritação experimental na pata de ratos decorre de ser esta a técnica mais amplamente utilizada para detecção de atividade anti-inflamatória de drogas. Assim, por exemplo, sabemos que o componente artrítico da doença auto-imune produzida em ratos pela injeção do adjuvante de Freund é susceptível à inibição contra-irritativa. Esse tipo de artrite se assemelha à artrite reumatoide humana quanto aos mecanismos imunológicos, aos eventos celulares, as alterações ósseas e a responsividade a drogas (ATKINSON, 1971).

Numerosos outros tipos de inflamação aguda são passíveis de sofrer inibição por contra-irritação como por exemplo a exsudação pleural (LADEN, 1958), reações provocadas pela bradicinina na pele de ratos (BONTA E De VOS, 1969), inflamação do saco conjuntival de coelhos (WINTERNITZ, 1901; AMBERG, 1917) os edemas produzidos pela administração de levedura, de dextran, bem como pelo formol (GOLDSTEIN E COLS., 1967). Não se sabe se estes processos podem ser inibidos pelos polisorbatos.

Passaremos a analisar agora o efeito de dois anti-inflamatórios não esteróides sobre a edemagênese produzida pelos polisorbatos. Duas questões nos parecem importantes em relação aos resultados obtidos com aspirina e indometacina. Primeiro, a incapacidade quase total de bloqueio da resposta edemagênica aos Tweens. A inibição, mesmo quando foi significativa no nível estatístico escolhido foi sempre pequena e irregular, deixando claro a ineficiência do bloqueio e que não

se justifica o uso dessas substâncias para antagonizar processos inflamatórios produzidos pelos polisorbatos. Em outras palavras, o critério estatístico quando preenchido, corresponde a inibição de resposta restrita a uns 25% para a aspirina e menor que 20% para a indometacina. Em segundo lugar, chama a atenção a verificação experimental, exaustivamente confirmada, de que os bloqueios não obedecem, por vezes, a relação dose-efeito, tanto com relação à aspirina como pela IDMTC.

Vários autores mostraram que o salicilato de sódio e a aspirina são equiefectivos como drogas anti-inflamatórias, mas não se comparam entre si como inibidores de biosíntese de prostaglandinas, o que levou à proposta de que esses dois efeitos não estejam necessariamente interligados (SMITH, 1975; BONTA E COLS., 1977). Apesar da introdução de muitos medicamentos novos, a aspirina ainda é o analgésico, antipirético e anti-inflamatório mais amplamente prescrito, e o padrão para comparação de atividade anti-inflamatória de outras drogas (FLOWER E COLS., 1975).

A tentativa de esclarecer participação de radicais do oxigênio na edemagênese pelos Tweens ainda nas fases iniciais do edema de pata, esbarra na dificuldade descrita por Oyanagui de que a própria dismutase do superóxido (SOD) aplicada na pata induz, ela própria, a resposta inflamatória, por suas propriedades irritantes (OYANAGUI, 1976). Vale lembrar ainda a possibilidade da participação de radicais livres do oxigênio não só produzidos pelos agonistas mas também pela IDMTC e AAS. DEL SOLDATO E COLS., (1985) mostraram que úlceras pela IDMTC no trato digestivo podem ser inibidas por substâncias "scavengers" de radicais livres como a aminopirina, o

PTTU (1-fenil-3-(2-tiazolil)2-tiourea) e o MK 447 e que a prévia irradiação da indometacina com radicais hidroxila leva ao aumento da ulcerogênese mesmo em relação às doses maximais já utilizadas.

Mais dois fatores podem ser importantes para construir uma hipótese explicativa dos resultados obtidos com AINE: primeiro, a própria variação da capacidade de radicais livres pela IDMTC e segundo, pela heterogeneidade dos animais em relação as suas reservas redutoras e enzimáticas capazes de neutralizar radicais livres. Em relação a AAS, nas doses utilizadas, esta substância produz um aumento substancial do consumo de oxigênio por conta do desacoplamento da fosforilação oxidativa, do qual decorre inibição da síntese de ATP, depleção do glicogênio hepático e muscular, diminuição do metabolismo aeróbico por numerosas desidrogenases, em parte por liberação de adrenalina por ativação simpática adrenal (FLOWER E COLS., 1985). Outro fato que pode ser importante, especificamente com relação a salicilatos, é que nas altas doses utilizadas, podem provocar a liberação de esteróides do adrenocórtex e além disso, deslocam estes que eventualmente estejam ligados a proteínas plasmáticas. Deve-se acrescentar ainda a participação eventual do fator irritante através do fenômeno de contra-irritação.

Os fatos experimentais mostram que existe um componente importante no processo edemagênico induzido pelos Tw que é algumas vezes susceptível à pequena inibição pelos AINE. Outras vezes esse componente inexistente no edema provocado pela mesma concentração do mesmo produto. Não existem ainda medidas diretas da atividade leucocitária na região subplan

tar injetada com um dos polisorbatos. Numa fase precoce da edema a participação de leucócitos é improvável seja porque o volume máximo coletado na região já ocorre aos trinta minutos ou uma hora. Também os polisorbatos administrados por via sub-cutânea no dorso de ratos não produzem edema, nem mesmo reação granulomatosa crônica, ainda que observados durante meses (observações nossas, não publicadas).

As características das soluções injetadas, as condições rigorosamente padronizadas, supostamente ideais deixam entretanto incertezas face as respostas inesperadas obtidas frente aos AINE, mostrando desse modo, que pelo menos um fator de variação permanece fora de controle. Efeitos contraditórios de drogas anti-inflamatórias não esteróides já foram detectados e descritos por outros autores como CHAMPION E COLS., (1977) e CONROY E DE WECK, (1981), GOMES E PEARCE, (1988). As explicações para esses fenômenos foi ou não encontrada, levando-se em consideração principalmente o grau de complexidade da estrutura biológica utilizada ou a variação do seu estado funcional. Observamos que, de modo geral, não se observam discrepâncias nas relações dose-efeito dos agonistas polisorbatos utilizados. Assim, nos experimentos de GOMES E PEARCE, (1988), a aspirina ora potencializou, ora inibiu e ora não teve qualquer efeito sobre a liberação de histamina de mastócitos, concluindo esses autores que a discrepância aparente nos resultados decorreria da própria multiplicidade de ações dos AINE sobre estas células, já que além de inibir a ciclooxigenase, interferem com a translocação do  $Ca^{2+}$  e ainda produzem labilização da membrana plasmática.

Já quanto à ação da dexametasona, sabemos

que o mecanismo da ação anti-inflamatória dos glicocorticóides em geral é complexo e desafiou o esforço de numerosos investigadores durante décadas. Esses esteróides induzem a biossíntese de lipocortinas (FLOWER E BLACKELL, 1979) já isoladas e caracterizadas por HIRATA E COLS., (1980) que inibem a atividade da fosfolipase celular reduzindo a disponibilidade do ácido araquidônico, substrato precursor da biossíntese de prostaglandinas vasodilatadoras. Dessa forma a supressão do processo inflamatório decorre da inibição do aumento do fluxo sanguíneo da microcirculação, acrescido de inibição da permeabilidade da parede venular, TSURUFUJI E COLS. (1979). Estas seriam as ações anti-inflamatórias mais precoces dos corticoesteróides, que têm maior probabilidade de operar nos períodos de edema agudo pelos polisorbatos já aos 30 minutos. Nesse período, as ações anti-inflamatórias do corticoesteróide sobre leucócitos polimorfonucleares devem ser pouco importantes quantitativamente pela razão já apontada.

Sabe-se que o número de neutrófilos circulantes no sangue aumenta pela administração de corticoesteróides no rato, em várias outras espécies animais, e no homem. Apesar desse aumento, há redução do acúmulo dessas células nas regiões inflamadas (DI ROSA, 1978) o que tem sido atribuído à supressão imposta pelos esteróides anti-inflamatórios à reatividade vascular, já que a eficiência dessas substâncias é elevada somente quando administradas localmente. O número de linfócitos e monócitos é diminuído pelos esteróides anti-inflamatórios, tanto na circulação, quanto nas áreas inflamadas.

Até que ponto a redução do edema inflamatório pelos AINE decorre de participação de corticoesteróide en-

dógeno liberado em pequena quantidade é difícil de estimar. Considerando porém a existência de uma liberação contínua de corticoesteróide endógeno cuja supressão pela adrenalectomia se traduz pelo aumento da resposta edemagênica de pata (CASTRO, 1986) em relação aos animais normais, deve-se aceitar como muito provável, alguma participação do componente anti-inflamatório adrenocortical também naqueles animais tratados por grandes doses de AINE. Deve-se considerar ainda que nas concentrações usadas desses AINE o fator irritação, intrínseco a essas moléculas, constitui fator adicional de variabilidade de resposta. Que o edema pelos polisorbatos responde dramaticamente à dexametazona está claramente demonstrado nos nossos experimentos (figuras 27, 28 e 29).

A terfenadina (TFND) exerce seu efeito primário sobre o receptor  $H_1$  da histamina. Usando técnicas de "binding" in vitro com proteína receptora isolada de cérebro e de íleo de cobaia homogeneizados, demonstrou-se diretamente que a atividade é específica e seletiva para receptores  $H_1$ . A concentração "in vitro" de TFND que inibe a ligação da  $^3H$ -mepiramina de 50% (IC 50) é de 0,2 e 0,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  respectivamente para receptores  $H_1$  do íleo e do cérebro. Estudos com traçadores radioativos justificaram a ausência de efeitos sobre o SNC, mostrando que a TFND não cruza a barreira hemato-encefálica em quantidades suficientes para afetar a atividade cerebral (HENAHAN, 1983).

Quanto a especificidade sabemos que a TFND possui apenas mínima atividade anti-serotonínica, e que nas doses de 3,2 ou 32  $\text{mg.Kg}^{-1}$  não produz inibição contra urticárias provocadas pela serotonina em ratos (SORKIN E HEEL, 1985). Tam

bém a ação anticolinérgica é muito discreta e clinicamente a TFND não protege as vias aéreas do efeito constritor da metacolina inalada (RAFFERTY E HOLGATE, 1987). A ausência de efeitos inespecíficos da TFND levou vários autores a sugerir que a eficácia desta substância na terapêutica da asma brônquica humana deve ser interpretada como participação maior da histamina nesta doença, do que é geralmente admitido, (TAYTARD E COLS., 1987). Também a interação com receptores adrenérgicos é insignificante, sendo a TFND incapaz de modificar a frequência dos batimentos espontâneos do átrio isolado de cobaia em concentração de  $1 \text{ u mol.L}^{-1}$  e provocando mínimo antagonismo do efeito da noradrenalina nesta mesma preparação, quando a  $10 \text{ ug L}^{-1}$ .

A TFND também não produz alterações mensuráveis no EEG, sobre o comportamento, ou sobre a frequência crítica de fusão do lampejo (SORKIN E HEEL, 1985). Baseado na citada afirmativa de TAYTARD E COLS. (1987) admitimos "a priori" uma significativa participação da histamina no edema provocado pelo polisorbato 80. Considerando que o edema pelo Tw 80 perdura longamente, pode se observar (figura 30) que provavelmente a participação da histamina na gênese do edema é mais importante até a quinta hora da aplicação do flogógeno. Entretanto a medida direta da histamina liberada é essencial para conclusão definitiva sobre essa participação.

O perfil farmacológico obtido por nós da resposta do edema de pata aos AINE, à dexametazona e à terfenadina, coincide com os resultados de DI MARTINO E COLS., (1987) que podem ser assim resumidos: 5 a 12% de inibição do edema de pata provocado pela injeção de ácido araquidônico (0,1 ml da solução 0,2 M) quando o inibidor é a indometacina, ou outros

dentre os vários AINE. Esta inibição cresce para 38% com o uso da dexametazona e também 38% quando o pré-tratamento foi feito com o anti-histamínico clorfeniramina. Neste último caso, a responsividade ao antagonista de receptores  $H_1$  da histamina levou os autores a admitir que, pelo menos em parte, a histamina contribue com o aparecimento do edema. O edema produzido pelos polisorbatos distingue-se francamente daquele provocado pela CRRG, o qual responde aos AINE mas não à ciproheptadina, inibidor com atividade anti-histamínica e anti-serotonínica, (WINTER E COLS., 1962).

O estudo do edema experimental provocado pela administração dos polissorbatos está, como vimos, apenas iniciado. As conclusões às quais chegamos são poucas mas representam um começo bastante seguro quanto as propriedades dessas substâncias nesse contexto. A etapa importante da análise dos mediadores químicos, que deverá se seguir, não poderia anteceder essas observações fundamentais.

## CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

1. Os polisorbatos 20, 40, 60 e 80 injetados por via subplanar em ratos provocam edema diretamente proporcional à concentração, atingindo valor máximo após 1,5 a 2,0 horas e com duração em torno de 30 horas.
2. Os edemas produzidos por esses polisorbatos são fortemente inibidos pela dexametazona e pelo antagonista de receptores  $H_1$  da histamina, terfenadina. São entretanto, pouco ou nada afetados pelos AINE indometacina e aspirina.
3. Aplicados simultaneamente nas patas posteriores direita e esquerda os polisorbatos inibem significativamente a edemagênese própria e aquela provocada pela CRRG. Esta, por sua vez também inibe o edema dos polisorbatos caracterizando o fenômeno de contra-irritação.
4. A intensidade dos edemas produzidos não guarda relação com a tensoatividade das soluções, quer a 25% quer a 50%, injetadas.
5. A viscosidade dos polisorbatos foi também medida verificando-se que não guarda correlação com o volume do edema produzido.

**SUMMARY**

## S U M M A R Y

The acute edemagenic effect of four polysorbates (20, 40, 60, and 80) was studied in Wistar rats, after subcutaneous injections in the sole of the hindlimbs. These substances induced a similar pattern of paw edema, that was thoroughly followed by pletismographic measurements during 7 hours, and eventually 48 hours. At the standardized experimental conditions, the highest used concentrations of the polysorbates induce about 600 to 900 microlitres of increased paw volume, the maximum being collected after approximately 90 minutes, although about 70% of this could be already recorded 30 minutes from the injections.

The edemas are strongly inhibited by dexametasone and by the H<sub>1</sub>-histamine receptor antagonist terfenadine, but are little or not sensitive to inhibition by the non-steroid anti-inflammatory agents indomethacin or aspirin.

The polysorbates exhibit the phenomenon of counter irritation, that is, a high degree of inhibition of the edema volume can be observed when one of these substances is simultaneously injected in both hindpaws of the same animal.

No quantitative correlation could be found out between the edemagenic responses to the polysorbates and the viscosity or the tensoactivity of the injected solutions.

.....

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## BIBLIOGRAFIA

- ABREHEM, K. & ZAMIRI, I., 1980. Inhibition of Corynebacterium ulcerans toxin production by tween 80. J. Med. Microbiol. 13: 581-5.
- AMBERG, S.; LOEVENHART, A. S. & McCLURE, W. B., 1917. The influence of oxygen upon inflammatory reactions. J. Pharmacol. exp. Ther. 10: 209-35.
- ADAMSON, A. W., 1976. Capillarity. In: WILEY, J. & SONS. Physical chemistry of surfaces. 3<sup>a</sup> ed., New York; Wiley-Interscience; cap. 1 p. 1-43.
- ANDRÉN, L. & THEANDER, G., 1961. Emptying effect on the bladder of tween 80 and some compounds. Gastroenterology 40(5): 636-7.
- ATKINSON, D. C., & HICKS, R., 1971. Relationship between the anti-inflammatory and irritant properties of inflammatory exudate. Brit. J. Pharmacol. 41: 480-7.
- AZAZ, E.; SEGAL, R. & MILO-GOLDZWEIG, I., 1981. Hemolysis caused by polioxyethylene-derived surfactants. Evidence for peroxide participation. Biochim. Biophys. Acta 646: 444-9.
- BARNETT, J. B., 1981. Immunosuppressive effects of tween on mice. Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 66: 229-32.
- BILLINGHAM, M. E. J.; ROBINSON, B. V. & ROBSON, J. M., 1969. Partial purification of the anti-inflammatory factor(s) in inflammatory exudate. Brit. J. Pharmacol. 35: 543-57.
- BONTA, I. L. & De VOS, C. J., 1969. A natural anti-inflammatory response evoked by acute experimental inflammation. In: BERTELLI, A.; HOUCK, J. C. eds. Inflammation Biochemistry

- and Drug Interaction. Amsterdam, Excerpta Medica p. 118-21.
- BONTA, I. L.; BULT, H.; VINCENT, J. E. & ZIJLSTRA, F. J., 1977. Acute anti-inflammatory effects of aspirin and dexamethasone in rats deprived of endogenous prostaglandin precursors. J. Pharm. Pharmacol. 29: 1-7.
- BONTA, I. L., 1978. Endogenous modulators of the inflammatory response. In: Inflammation (Handbook of Experimental Pharmacology vol. 50/I). VANE, J. R. & FERREIRA, S. H. eds., Berlin, Springer-Verlag, p. 523-60.
- CASLEY-SMITH, J. R. & FLOREY, H. W., 1961. The structure of normal small lymphatics. Quart. J. exp. Physiol. 46: 101-6.
- CASLEY-SMITH, J. R., 1985. Editorial: The importance of the lymphatic system. Agents Actions 16(5): 335.
- CASTRO, G. A. V., 1986. Estudo experimental do edema e da contra-irritação produzidos pela carrageenina em ratos. Campinas p. 91. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas.
- CHAMPION, G. D.; DAY, R. O.; & WADE, D. N., 1977. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on adenosine triphosphate content and histamine release from rat peritoneal cell suspensions rich in mast cells. Brit. J. Pharmac. 59: 29-33.
- COLLETT, J. H.; WITHINGTON, R. & COX, B., 1974. The correlation between the in vitro and in vivo availability of salicylic acid for membrane transfer from polysorbate 20 solutions. J. Pharm. Pharmacol. 26: 34-38.
- CONROY, M. C. & De WECK, A. L., 1981. Effect of aspirin and indomethacin on histamine release from leukocytes of patients with suspected intolerance to aspirin. Int. Arch. Allergy appl. Immunol. (Suppl. 1) 152-3.

- De LEO, V. A.; HARBER, L. C.; KONG, B. M., & De SALVA, J., 1987. Surfactant-induced alteration of arachidonic acid metabolism of mammalian cells in culture. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 184: 477-82.
- DEL SOLDATO, P.; BENONI, G. & SCARPIGNATO, C., 1985. Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. Agents Actions 17(5/6): 484-88.
- DESAI, J. D.; PATEL, H. C. & DESAI, A. J., 1986. Effect of tween series surfactants on production by submerged cultures of Claviceps species. J. Ferment. Technol. 64(6): 499-501.
- DI MARTINO, M. J.; CAMPBELL Jr., G. K.; WOLFF, C. E. & HANNA, N., 1987. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat paw edema. Agents Actions 21 (3/4): 303-5.
- Di ROSA, M., 1978. Inhibition of cell migration in vivo and granuloma formation. In: Anti-inflammatory Drugs (Handbook of Experimental Pharmacology vol. 50/II). VANE, J. R. & FERREIRA, S. H. eds. Berlin, Springer-Verlag, p. 223-45.
- DONBROW, M.; AZAZ, E. & PILLERSDORF, A., 1978. Autoxidation of polysorbates. J. Pharm. Sci. 67(12): 1676-81.
- EAGLE, E. & POLING, C. E., 1956. The oral toxicity and pathology of polyoxyethylene derivatives in rats and hamsters. Food Res. 21(3): 348-61.
- FELMEISTER, A., 1972. Relationships between surface activity and biological activity of drugs. J. Pharm. Sci. 61(2): 151-64.
- FLOWER, R. J. & BLACKWELL, G. L., 1979. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor which prevents prostaglandin generation. Nature (London) 278: 456-59.
- FLOWER, R. J.; MONCADA, S. & VANE, J. R., 1985. Drug therapy of

- inflammation. In: GILMAN, G. A.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W. & MURAD, F. eds. The pharmacological basis of therapeutics, 7<sup>o</sup> ed. New York, McMillan, cap. 29, p. 674-715.
- GARCIA LEME, J., 1981. Regulatory mechanisms in inflammation: New aspects of autopharmacology. Gen. Pharmacol. 12: 15-24.
- GLASSMAN, H. N., 1950. Hemolytic activity of some nonionic surface-active agents. Science 111 688-9.
- GOLDSTEIN, S.; SHEMANO, R.; DEMEO, R. & BEILER, J. M., 1967. Anti-inflammatory activity of several irritants in three models of experimental inflammation in rats. Arch. int. Pharmacodyn. 167(1): 39-53.
- GOMES, J. C. & PEARCE, F. L., 1988. Comparative studies on the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on histamine release from mast-cells of rat and guinea pig. Agents Actions 24(3/4): 266-71.
- GOWAN, W. G.; TIO, F.; LAMP, K.; GOWAN, C. & STAVCHANSKY, S., 1986. The effects of Tween 80, Mirj 52 and PEG 8000 upon the rate of pentobarbital disappearance, cumulative water flux and histological changes in the rat small intestine. Int. J. Pharm. 29: 169-76.
- GUYTON, A. C., 1969. Pulmonary ventilations. In: Textbook of Medical Physiology. 3<sup>o</sup> ed., Saunders Company, Philadelphia and London, p. 545-59.
- HELENIUS, A. & SIMONS, K., 1975. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79.
- HENEHAN, J., 1983. No sneezing, or dosing, seen with new H<sub>1</sub> blocker. J. Am. Med. Assoc. 249: 3151-2.
- HERRINGTON, T. M. & SAHI, S. S., 1986. Temperature dependence of micelar aggregation number of aqueous solutions of

- sucrose monolaurate and sucrose monooleate. Colloids and Surfaces 17: 103-13.
- HIEMENZ, P. C., 1977. The viscosity of dilute dispersions. In: LAGOWSKI, J. J. ed. Principles of colloid and surface chemistry; New York & Basel, Marcel Dekker, Inc. p. 42-83.
- HIRAI, S.; YASHIKI, T. & MIMA, T., 1981. Mechanism for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. Int. J. Pharm. 9: 173-84.
- HIRATA, F.; SCHIFFMANN, E.; VENKATASUBAMANIAN, K.; SALOMON, D. & AXELROD, J., 1980. A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 2533-6.
- HURLEY, J. V., 1978. The sequence of early events. In: Inflammation (Handbook of Experimental Pharmacology vol. 50/I). VANE, J. R. & FERREIRA, S. H. ed. Springer Verlag, Berlin. p. 523-60.
- JACOBS, H. C.; BERRY, D. D.; DUANE, G.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H. & JONES, S., 1985. Normalization of arterial blood gases after treatment of surfactant-deficient lambs with tween 20. Am. Rev. resp. Dis. 132: 1313-8.
- KOBAYASHI, H.; NISHIMURA, T.; OKUMURA, K.; MURANISHI, S. & SEZAKI, H., 1974. Effect of polysorbates on absorption rates of water-soluble, micelle-free drugs administered intramuscularly in the rat. J. Pharm. Sci. 63: 580-4.
- KUSEL, J. R.; STONES, L. & HARNETT, W., 1982. The interaction of membrane-active compounds with the surfaces of schistosomula and adult Schistosoma mansoni. Biophys. J. 37: 32-4.
- LADEN, C.; BLACKWELL, R. Q. & FOSDICK, L. S., 1958. Anti-inflammatory effects of counterirritants. Am. J. Physiol. 195: 712-8.
- MASINI, E.; PLANCHENAU, J.; PEZZIARDI, F.; GAUTIER, P. & GAGNOL,

- J. P. , 1985. Histamine-releasing properties of polysorbate 80 "in vitro" and "in vivo": correlation with its hypotensive action in the dog. Agents Actions 16(6): 470-7.
- NAKAGAWA, T. & SHINODA, K., 1963. Physicochemical studies in a-  
queous solution of nonionic surface active agents. In: LOEBL,  
E. M. ed. Colloidal surfactants—some physicochemical proper-  
ties, 2<sup>o</sup> ed. New York, Academic Press, cap. 2, p. 97-175.
- OYANAGUI, Y., 1976. Participation of superoxide anions at the  
prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. Biochem.  
Pharmacol. 25: 1465-72.
- POLING, C. E.; EAGLE, E. & RICE, E. E., 1956. Effects of fee-  
ding polyoxyethylene preparations to rats and hamsters.  
Food Res. 21(3): 337-47.
- RAFFERTY, P. & HOLGATE, S. T., 1987. Terfenadine (Seldane) is  
a potent and selective histamine H<sub>1</sub> receptor antagonist in  
asthmatic airways. Am. Rev. resp. Dis. 135(1): 181-4.
- ROBINSON, B. V. & ROBSON, J. M., 1964. Production of an anti-  
inflammatory substance at site of inflammation. Brit. J.  
Pharmacol. 23: 420-32.
- ROCHA E SILVA, M.; CAVALCANTI, R. O. & REIS, M. L., 1969.  
Anti-inflammatory action of sulfated polysaccharides.  
Biochem. Pharmacol. 18: 1285-95.
- SAKAI, K.; KUTSUNA, T. M.; NISHIMO, T.; FUJIHARA, Y. & SATA  
N., 1986. Contribution of calcium ion sequestration by  
polyoxyethylated nonionic surfactants to the enhanced colo-  
nic absorption of p-aminobenzoic acid. J. Pharm. Sci. 75(4):  
387-90.
- SCHÖNFELDT, N., 1969. Description of ethylene oxide adducts.  
In: Surface Active Ethylene Oxide Adducts. 1<sup>o</sup> ed. Hungary,

Pergamon Press, 3.31, p. 157.

SCHOTT, H. & ROYCE, A. E., 1986. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants VII. Suspension stability. Colloids and Surfaces 19: 399-418.

SEEMAN, P. M. & BIALY, H. S., 1963. The surface activity of tranquilizers. Biochem. Pharmacol. 12: 1181-91.

SHINODA, K., 1970. Thermodynamic aspects of nonionic surfactant-water systems. J. Colloid Int. Sci. 34(2): 278-82.

SMITH, M. J. H.; FORD-HUTCHINSON, A. W. & ELLIOT, P. N., 1975. Prostaglandins and the anti-inflammatory activities of aspirin and sodium salicylate. J. Pharm. Pharmacol. 27: 473-8.

SORKIN, E. M. & HEEL, R. C., 1985. Terfenadine. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. Drugs 29: 34-56.

TAGESSON, C. & EDLING, C., 1984. Influence of surface-active food additives on the integrity and permeability of rat intestinal mucosa. Fd. Chem. Toxic. 22(11): 861-64.

TAYTARD, A.; BEAUMONT, D.; PUJET, J. C.; SAPENE, M. & LEWIS, P. J., 1987. Treatment of bronchial asthma with terfenadine, a randomised controlled trial. Brit. J. Clin. Pharm. 24: 743-6.

THOMAN, C. J., 1986. Ionophoric properties of polysorbate 80. J. Pharm. Sci. 75(10): 983-6.

TSAI, Y. H.; YANG, M. Y, & NAITO, S. I., 1986. Stability anti-inflammatory effect and percutaneous absorption of indomethacin in absorption ointment formulations. Int. J. Pharm. 28: 47-58.

TSURUFUJI, S.; SUGIO, K. & TAKEMASA, F., 1979. The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. Nature 280: 408-410.

- UNGAR, G., 1969. Role of humoral and cellular protease systems in inflammation. In: Inflammation Biochemistry and Drug Interaction. BERTELLI, A. & HOUCK, J. C. ed. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, p. 3-11.
- VINEGAR, R., & TRUAX, J. F., 1970. Some characteristics of the anti-inflammatory activity of carrageenin in rats. Pharmacologist 12: 202.
- WHITMORE, D. A.; BROOKES, L. G. & WHEELER, K. P., 1980. Inhibition of peristalsis in rat jejunum by non-ionic surfactants. J. Pharm. Pharmacol. 36: 62-3.
- WINDER, C. V.; WAX, J. & BEEN, M. A., 1957. Rapid foot volume measurements of unanesthetized rats and the question of a phenylbutazone effect on anaphylactoid edema. Arch. Int. Pharmacodyn. 112: 174.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A. & NUSS, G. W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111: 544-7.
- WINTERNITZ, R., 1901. Über die entzündungswidrige Wirkung ätherischer Öle. Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. exp. Path. Pharmak. 46: 163-80.
- ZULAUF, & ROSENBUCH, J. P., 1983. Micelle clusters of octylhydroxyoligo (oxythylenes). J. Phys. Chem. 87: 856-62.