

## EFEITO DO TRATAMENTO COM NIMESULIDA SOBRE A INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA EM CAMUNDONGOS<sup>1</sup>

BATISTA, Valbert Alves<sup>2</sup>  
COSTA, Graciomar C.<sup>3</sup>  
ASSUNÇÃO, Anne Karine M.<sup>4</sup>  
SILVA, Mayara Cristina P.<sup>4</sup>  
LOPES, Diêgo Arruda<sup>4</sup>  
ARAÚJO, Marcio Antonio R.<sup>5</sup>  
SILVA, Lucilene Amorim<sup>6</sup>  
GUERRA, Rosane Nassar M.<sup>6</sup>  
NASCIMENTO, Flávia Raquel F.<sup>6\*</sup>

**Resumo:** O granuloma induzido por corpo estranho é um modelo experimental de inflamação subcrônica que permite a avaliação do efeito de fármacos sobre o extravasamento vascular (edema) e sobre o infiltrado celular. A Nimesulida é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) que age por vários mecanismos e é largamente utilizada por sua boa tolerabilidade e comodidade de administração. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da Nimesulida sobre o modelo de granuloma induzido por corpo estranho. Camundongos Swiss machos (n=6/grupo) receberam implantes subcutâneos de algodão previamente pesados e esterilizados. O grupo Nimesulida foi tratado com o fármaco na dose de 5mg/kg a cada 12 horas, por via oral, por seis dias. Os animais do grupo Controle receberam igual volume de água estéril e aprotínica por via oral, nos mesmos intervalos e pelo mesmo período. Um dia após o período de tratamento, os animais foram sacrificados, os implantes de algodão retirados e obtido o peso úmido. Os implantes foram pressionados contra lâminas, posteriormente coradas e utilizadas para a contagem diferencial de células. Após dessecação por 48 horas em estufa, foi obtido o peso seco. Houve diminuição significativa do peso úmido do implante e significativa alteração do padrão do infiltrado celular do granuloma, com diminuição de neutrófilos e aumento de macrófagos nos animais tratados com Nimesulida, que apresentaram um padrão tissular de inflamação mais tardia se comparados aos animais do grupo Controle. Assim, o tratamento com Nimesulida modula a resposta inflamatória no modelo de granuloma por corpo estranho, podendo nesses casos ser utilizada como controle positivo.

**Descritores:** Inflamação; Granuloma; Nimesulida.

**Abstract:** *Effect of treatment with Nimesulide on the granulomatous inflammation in mice.* The cotton pellet granuloma is a subchronic inflammation experimental model that allows to assessing the effect of drugs on the vascular leakage (edema) and on the cell infiltrate. Nimesulide is a NSAID that acts by several mechanisms and is widely used for its good tolerability and convenience of administration. This experiment aim was to verify the effect of Nimesulide on cotton pellet granuloma. Swiss male mice separated in two groups (n=6/group) received subcutaneous implants of cotton previously weighed and sterilized and began orally treatment with Nimesulide 5mg/kg at interval of 12 hours for six days. Control group animals received an equal volume of sterile and pyrogen-free water orally at the same interval and for the same period. One day after the treatment, the animals were sacrificed and had the implants removed. The wet weight was obtained and the implants pressed against glass slides, then stained and used for differential cell count. There was a significant decrease at the wet weigh and a significant change in the pattern of granuloma cellular infiltrate, with replacement of neutrophils by macrophages in animal treated with Nimesulide. This group showed a more chronic tissue quality compared to the Control group. Then, treatment with Nimesulide is able to modulate the inflammation in foreign body granuloma model and can be used as positive control.

**Descriptors:** Inflammation; Granuloma; Nimesulide.

<sup>1</sup> Artigo apresentado ao Curso de Medicina da UFMA como Trabalho de Conclusão de Curso.

<sup>2</sup> Graduando em Medicina pela UFMA.

<sup>3</sup> Farmacêutico-bioquímico, Doutorando em Patologia Experimental pela Fiocruz- BA.

<sup>4</sup> Mestres em Ciências da Saúde pela UFMA.

<sup>5</sup> Doutor em Biotecnologia pela RENORBIO- UFMA/UECE. Professor Doutor do UNICEUMA.

<sup>6</sup> Professoras Doutoradas do Departamento de Patologia da UFMA.

## INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo complexo produzido por uma variedade de alterações tissulares diante de uma lesão, que pode ser causada por agentes infecciosos, substâncias químicas, calor ou traumatismos, por exemplo. Durante o processo inflamatório, os tecidos liberam uma série de substâncias que provocam repercussões secundárias, sendo as principais a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento, migração e ativação de leucócitos, estes últimos responsáveis pela produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e realização de fagocitose no tecido. Esta resposta tem, a princípio, o objetivo de eliminar, neutralizar ou isolar o agente indutor da inflamação e promover paralelamente a isso o reparo dos tecidos agredidos pela lesão primordial e pelo próprio processo inflamatório<sup>12,18</sup>.

A inflamação granulomatosa é uma modalidade especial de resposta crônica dependente de vários tipos celulares, citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), indução de ciclooxigenase-2 (COX-2), entre outros fatores. Histologicamente, pode ser classificada em dois tipos: o primeiro, chamado granuloma imune, se forma em torno de agentes com capacidade antigênica expressiva, como micro-organismos. É rico em células mononucleares especializadas em secretar, mas com capacidade fagocítica diminuída, as células epitelióides. Há também macrófagos fundidos, com vários núcleos periféricos, as células gigantes do granuloma imune. O segundo tipo é o granuloma de corpo estranho, rico, sobretudo, em macrófagos maduros e células gigantes com núcleos dispostos sem organização especial no citoplasma. Os dois tipos de células gigantes compartilham as mesmas funções, mas são importantes na diferenciação, junto às células epitelióides, entre as duas modalidades de granuloma<sup>12,18</sup>.

Os modelos experimentais de inflamação são instrumentos de desenvolvimento de novas drogas e de melhor compreensão dos mecanismos de fármacos já existentes. O granuloma induzido pela implantação de corpo estranho com duração de sete dias é um modelo experimental de inflamação subcrônica, portanto de interface entre as inflamações aguda e

crônica. Permite a análise de fatores das várias fases da inflamação, desde a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular até a participação celular<sup>22</sup>.

Swingle, Shidman<sup>22</sup> (1972) descreveram o modelo como um processo marcado por uma fase inicial, chamada transudativa, que ocorre nas três primeiras horas após induzida a inflamação por implantação do corpo estranho. É uma fase passiva, caracterizada pelo extravasamento de líquido dos vasos do entorno do implante. A partir daí até o terceiro dia, começa a haver produção de exsudado inflamatório, rico em proteínas e poucas células, principalmente neutrófilos. E finalmente, do quarto ao sexto dia de inflamação, o tecido granulomatoso propriamente dito rico em células inflamatórias se instala na superfície do implante. É a chamada fase proliferativa.

As doenças inflamatórias são causadoras de importante repercussão negativa sobre a qualidade de vida dos pacientes, sobretudo por estarem intrinsecamente ligadas à dor e à destruição tissular potencialmente incapacitantes. Assim, drogas utilizadas no tratamento dessas doenças são largamente empregadas na prática clínica. Entre elas, destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)<sup>9,10,17</sup>.

A Nimesulida é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), com ação preferencialmente sobre a ciclooxigenase-2 (COX-2), indicada para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios de origem osteoarticular e musculoesquelética, e também como analgésico e antipirético, sendo amplamente prescrita. Além da inibição seletiva da COX-2, a Nimesulida neutraliza a formação de radicais livres de oxigênio produzidos durante o processo inflamatório<sup>5</sup>.

Outros efeitos atribuídos à Nimesulida são a capacidade de inibir a desgranulação de mastócitos, a liberação de histamina e a atividade de uroquinases. Parece também ativar o receptor de glicocorticóides, com repercussão sobre a transcrição de ciclooxigenase-2 e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, aumenta o 3'-5'-AMP (AMPc) celular, o que pode estar relacionado à inibição da liberação por leucócitos de enzimas degradadoras de tecidos, como as metaloproteinases (MPO)<sup>4,11,16</sup>.

Como outros AINEs, porém em alguns aspectos com maior potência, tem efeito inibitório sobre neutrófilos. Age diminuindo sua quimiotaxia, a pro-

dução de ROS, fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB4), HOCl (ácido hipocloroso), elastase e outros marcadores de atividade neutrofílica capazes de promover a destruição tissular. Pode inibir a aderência dos polimorfonucleares às células endoteliais, a exposição de L-selectina e a migração transendotelial dessas células<sup>8,13,15</sup>.

Segundo Rainsford<sup>16</sup> (2006) e Sawada<sup>19</sup> (2000), a Nimesulida diminui a liberação de TNF e produção de ROS, LTB4 e PAF por macrófagos e parece abreviar a vida dos monócitos, sugerindo estímulo a apoptose dessas células ou outra ação sobre seu crescimento. Sobre os eosinófilos, inibe quimiotaxia, produção de ROS e leucotrieno C4 (LTC4).

Essa grande variedade de efeitos atribuídos à Nimesulida pode torná-la um fármaco de grande empregabilidade em modelos experimentais de inflamação, como um controle positivo. Entre os modelos, o granuloma induzido por corpo estranho de algodão, dependente de múltiplos fatores, pode fornecer dados importantes à melhor compreensão dos mecanismos anti-inflamatórios da Nimesulida, assim como sugerir se o fármaco imprime a esse modelo de inflamação mudanças que possam ser comparadas aos efeitos de novos agentes a serem desenvolvidos para o tratamento da inflamação. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram analisar os efeitos do tratamento com Nimesulida sobre a inflamação granulomatosa induzida por corpo estranho e testar sua aplicabilidade como possível controle positivo nesse modelo de inflamação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com 10 semanas de idade, pesando em média 31 gramas, cedidos pelo Biotério da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil. Os animais foram divididos em dois grupos, Controle e Nimesulida, com seis animais cada, e mantidos à temperatura média de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 44-56%, sob ciclos normais de claro e escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração e à água. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados (parecer nº 010/2007) pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão.

### Modelo de inflamação: granuloma induzido por corpo estranho

O método adotado para formação de granuloma seguiu o descrito por Swingle, Shidman<sup>22</sup> (1972), com algumas modificações<sup>2</sup>, a fim de incluir a abordagem do tipo celular de infiltrado inflamatório. Os animais foram previamente anestesiados com solução de cloridrato de xilazina 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer S.A, Brasil) (20 mg/kg) e cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol<sup>®</sup>, König S.A, Argentina) (25 mg/kg), à proporção de 2:1 respectivamente, por via intramuscular. Em seguida, em condições assépticas, foi feita uma pequena incisão na pele da região dorsal inferior, e por divulsão do subcutâneo, foi criado um pertuito para colocação de implante de algodão na região interescapular. Os implantes foram previamente esterilizados e pesados ( $9,0 \pm 0,4\text{mg}$ ). No sétimo dia após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados por superdosagem anestésica e tiveram os implantes retirados e pesados (peso úmido). Além disso, outros materiais biológicos foram retirados para análise posterior.

Após a obtenção do peso úmido, os implantes foram pressionados contra lâminas de vidro, técnica conhecida como “inprint”. As lâminas foram secas à temperatura ambiente por 1 hora e coradas em seguida por panótipo rápido, utilizando-se o conjunto Instant-Prov (NewProv<sup>®</sup>). Após 24 horas, foi realizada a contagem diferencial de células. Em seguida, os implantes de algodão foram dessecados em estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas e pesados novamente para avaliar o peso seco (relativo ao infiltrado inflamatório).

Para cálculo do edema, subtraiu-se o peso seco do peso úmido do implante. Essa diferença foi considerada como a porção líquida extravasada durante o processo inflamatório, ou seja, o edema<sup>22</sup>.

Como descrito por Karthikeyan<sup>10</sup> (2011), o efeito do fármaco sobre o desenvolvimento do granuloma foi calculado usando-se a fórmula:

$$[(Pc - Pt) / Pc] \times 100$$

Em que Pc é o peso do granuloma dos animais controle e Pt dos animais tratados.

## Tratamento

O fármaco utilizado foi a Nimesulida (Nisulid<sup>®</sup>, Aché S.A, Brasil) diluída em água de injeção (estéril e apirogênica) e administrada por gavagem na dose de 5mg/kg a cada 12 horas, durante seis dias consecutivos. O tratamento foi iniciado 1 hora após o implante do algodão e os animais do grupo Controle receberam igual volume de água de injeção, também por gavagem e em duas aplicações diárias, pelo mesmo tempo do tratamento.

## Avaliação dos efeitos sistêmicos do tratamento com Nimesulida

Para avaliar o efeito sistêmico do tratamento com Nimesulida sobre as células do sistema imune, foram colhidos o sangue, o lavado peritoneal, o baço, os linfonodos mesentéricos e a medula óssea. As células foram então processadas e contadas conforme descrito a seguir.

## Análises hematológicas

Para as análises hematológicas, o sangue foi coletado por punção retro-orbital e transferido para tubos cônicos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL, contendo EDTA. Foi obtida a contagem total de leucócitos em analisador hematológico automático veterinário (PocH-100iVDiff, Sysmex, Brasil). Para a contagem diferencial das células sanguíneas, foram coletadas duas gotas de sangue para a preparação do esfregaço sanguíneo corado por panótipo rápido, utilizando-se o conjunto Instant-Prov (NewProv<sup>®</sup>). As células foram quantificadas em microscópio óptico de luz comum.

## Quantificação total e diferencial das células obtidas da cavidade peritoneal

Para a quantificação das células peritoneais, foi feita lavagem da cavidade peritoneal com injeção de 5mL de solução tamponada de fosfato (PBS) estéril, colhida com auxílio de seringa de 5mL, mantida em tubos de polipropileno com fundo cônico e deixada em banho de gelo ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ). Para determinação da celularidade total, 90 $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionadas a 10 $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 0,05%, dissolvido em ácido acético a 30%, e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

A suspensão de células peritoneais teve sua concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL e 200 $\mu\text{L}$  desta suspensão foram centrifugados em citocentrífuga (CT-12, Presvac, Brasil) e corados por panótipo rápido, utilizando-se o conjunto Instant-Prov (NewProv<sup>®</sup>). A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico de luz comum.

## Quantificação das células obtidas do baço, linfonodo mesentérico e medula óssea

Baço, linfonodo mesentérico e medula óssea foram coletados logo após a lavagem da cavidade peritoneal. Linfonodo e baço foram processados em 1 e 5mL de PBS, respectivamente. O fêmur teve o canal medular instilado com 1mL de PBS. Para determinação da celularidade, 90 $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionados a 10 $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 0,05% dissolvido em ácido acético a 30%, e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

## Análise Estatística

Os dados estão expressos como média ou média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi feita por teste *t* de Student, sendo o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Efeito do tratamento com Nimesulida sobre a formação do granuloma

O tratamento com Nimesulida por seis dias diminuiu os pesos úmido e seco, entretanto a diminuição foi significativa apenas em relação ao peso úmido. O peso do edema formado também foi significativamente reduzido após o tratamento (Tabela 1).

**Tabela 1** - Efeito do tratamento com Nimesulida sobre os pesos úmido, seco e do edema.

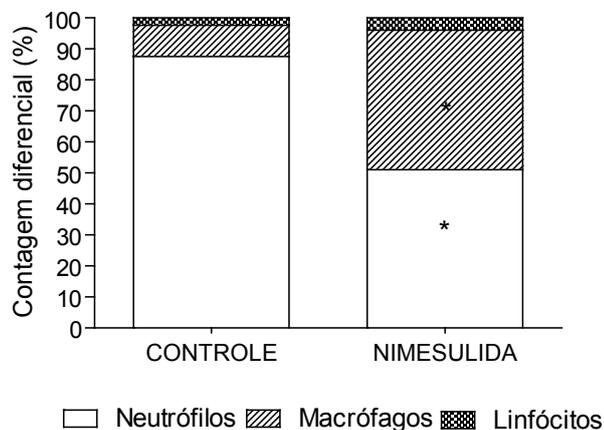
	Grupos		Efeito do Tratamento com Nimesulida (%)
	Controle	Nimesulida	
<b>Peso Úmido</b>	151,0 $\pm$ 19,5 <sup>a</sup>	115,0 $\pm$ 11,2*	↓23,8%
<b>Peso Seco</b>	26,8 $\pm$ 4,1	23,6 $\pm$ 3,2	↓12,0%
<b>Peso do Edema</b>	115,0 $\pm$ 12,1	91,4 $\pm$ 8,5*	↓20,52%

<sup>a</sup> Os dados representam a média em mg  $\pm$  desvio padrão.

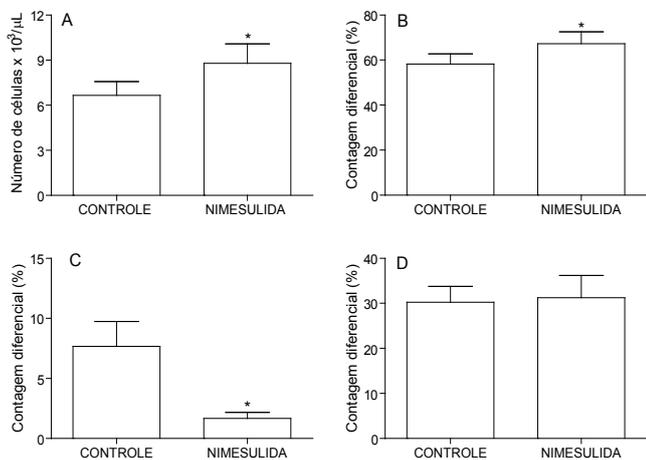
\* $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle

### Contagem diferencial das células do granuloma

O tratamento com Nimesulida induziu significativa diminuição do percentual de neutrófilos e aumento dos macrófagos no granuloma, quando comparado ao grupo Controle (Figura 1).



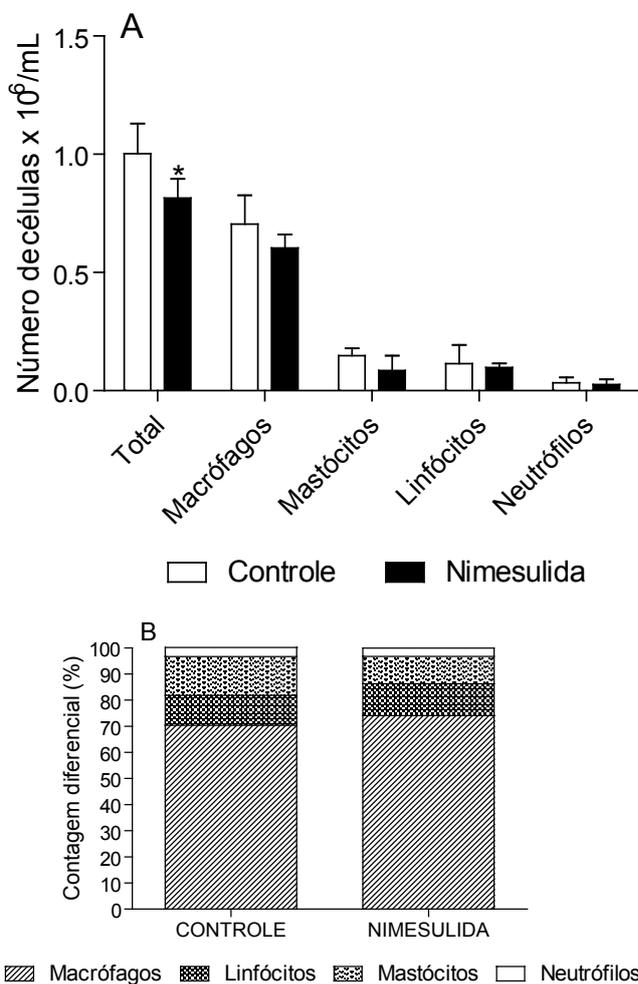
**Figura 1 - Efeito do tratamento com Nimesulida sobre a contagem diferencial de células do granuloma induzido por corpo estranho.** Camundongos Swiss tratados por via oral durante 6 dias a cada 12 horas com doses de 5mg/kg de Nimesulida (Nimesulida) ou água apirogênica (Controle) tiveram comparadas as contagens diferenciais de células de seus tecidos de granuloma. Os dados representam a média de seis animais por grupo em percentagem. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle.



**Figura 2 - Efeito do tratamento com Nimesulida sobre a contagem sanguínea de leucócitos.** Camundongos Swiss tratados por via oral durante 6 dias a cada 12 horas com doses de 5mg/kg de Nimesulida (Nimesulida) ou água apirogênica (Controle) tiveram colhidas amostras de sangue em tubos com EDTA, submetidas a processamento automatizado para contagem de leucócitos totais (A) e duas gotas de sangue para produção de esfregaços, cujas contagens diferenciais em microscópio mostraram linfócitos (B), monócitos (C) e neutrófilos (D). Os dados representam a média de seis animais por grupo  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle.

### Parâmetros hematológicos: contagens total e diferencial dos leucócitos

A contagem sanguínea evidenciou aumento estatisticamente significativo de leucócitos totais (Figura 2A) e linfócitos (Figura 2B) nos animais tratados com Nimesulida. Por outro lado, o percentual de monócitos foi significativamente menor quando comparado ao grupo Controle (Figura 2C). Não houve alteração no percentual de neutrófilos (Figura 2D).



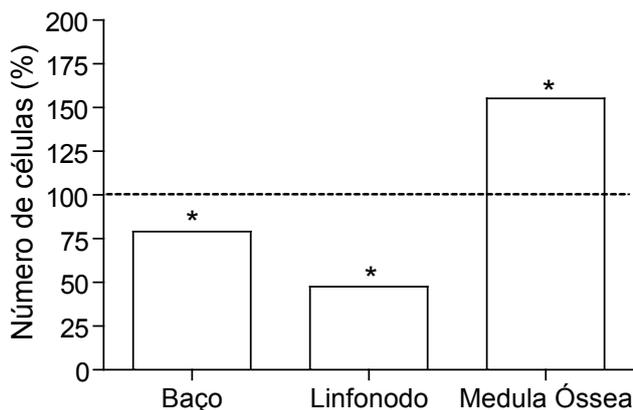
**Figura 3 - Efeito do tratamento com Nimesulida sobre a contagem de células peritoneais.** Camundongos Swiss tratados por via oral durante 6 dias a cada 12 horas com doses de 5mg/kg de Nimesulida (Nimesulida) ou água apirogênica (Controle) tiveram comparados os números total e diferencial de células peritoneais (A) e a proporção entre as populações celulares (B). Os dados representam a média de seis animais por grupo  $\pm$  desvio padrão em números absolutos (A) ou média em percentagem (B). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle.

### Contagens total e diferencial das células peritoneais

Nos animais tratados com Nimesulida, observou-se diminuição significativa da contagem total de células peritoneais em relação ao grupo Controle, mas não houve diferença significativa na contagem de macrófagos, mastócitos, linfócitos e neutrófilos peritoneais entre os dois grupos (Figura 3A). Não houve diferença também de proporção entre as populações celulares (Figura 3B).

### Celularidade dos órgãos linfóides

Nos animais que receberam Nimesulida por seis dias, houve diminuição estatisticamente significativa das celularidades do baço e do linfonodo mesentérico quando comparados ao grupo Controle. Na medula óssea, houve aumento significativo da contagem de células em relação ao grupo Controle (Figura 4).



**Figura 4 - Efeito do tratamento com Nimesulida sobre a contagem de células de órgãos linfóides.** Camundongos Swiss tratados por via oral durante 6 dias a cada 12 horas com doses de 5mg/kg de Nimesulida (Nimesulida) ou água apirogênica (Controle) tiveram contadas as células totais do baço, linfonodo mesentérico e medula óssea. Os dados representam a porcentagem de células do grupo Nimesulida em relação ao grupo Controle, representado pela linha tracejada (atribuído valor de 100% à contagem do grupo Controle). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle.

## DISCUSSÃO

No granuloma por corpo estranho, o efeito anti-inflamatório do fármaco pode ser avaliado considerando-se diversas variáveis, entre elas os pesos úmido, seco e do edema do implante após o sacrifício dos animais<sup>10,22</sup>.

Como descrito por Swingle, Shidman<sup>22</sup> (1972), enquanto o peso úmido dos implantes traduz a quantidade de fluidos e infiltrado celular transferidos ao algodão durante o processo inflamatório, o peso seco mensura, sobretudo, a quantidade de células que migrou para o foco da inflamação, afinal a porção líquida do exsudado é perdida quando da dessecação. O delta entre o peso úmido e o peso seco é, portanto, uma medida importante de avaliação da permeabilidade vascular e do edema.

Neste trabalho, foi demonstrado que a administração de Nimesulida induziu diminuição significativa do peso úmido e do edema dos implantes, mas não teve efeito significativo sobre o peso seco. Estes dados corroboram resultados anteriores que mostram que os AINEs apresentam efeito mais pronunciado sobre o peso úmido do granuloma e mais brandos sobre o peso seco<sup>3,22</sup>.

Por outro lado, Süleyman<sup>21</sup> et al. (2004) observaram, com o mesmo modelo de inflamação, diminuição significativa do peso seco em ratos que receberam Nimesulida em dose única diária de 10mg/kg por via oral. A diferença de efeito no tratamento com Nimesulida sobre o peso seco entre os estudos pode dever-se ao fato de Süleyman<sup>21</sup> et al. (2004) terem administrado o fármaco em dose única a cada dia de tratamento, enquanto nossos animais tiveram a mesma dose diária dividida em duas administrações, com intervalos de 12 horas.

A diminuição no peso úmido verificada durante o tratamento de seis dias com Nimesulida sugere haver importante ação do fármaco de forma inibidora no aumento da permeabilidade dos vasos do entorno do implante. Em relação ao peso seco, contrapondo-se à sua diminuição discreta, houve significativa alteração do perfil do infiltrado inflamatório dos animais tratados com Nimesulida, caracterizado por significativo aumento da contagem proporcional de macrófagos e diminuição da porcentagem de neutrófilos. Esse mesmo perfil de alteração do tecido granulomatoso em animais, porém tratados com diclofenaco, foi descrito por Ashok<sup>3</sup> et al. (2010).

Esses resultados vão ao encontro dos trabalhos que mostram que a Nimesulida parece inibir a adesão dos polimorfonucleares às células endo-

teliais, a exposição de L-selectina e a migração transendotelial dessas células. Além disso, inibe quimiotaxia, produção de superóxido, PAF, LTB<sub>4</sub>, HOCl, elastase e outros marcadores de atividade neutrofílica causadores de lesão tecidual<sup>8,13,15</sup>.

No presente trabalho, a queda do peso seco pode não ter sido significativa devido ao aumento proporcional de macrófagos no infiltrado. Essas células são maiores que os neutrófilos e podem inclusive fundir-se em células gigantes<sup>1</sup>, o que pode ter compensado a diminuição do número de neutrófilos no granuloma a ponto de não permitir queda importante do peso seco. O granuloma pode, portanto, ter menos células, mas estas serem de maior massa.

Os macrófagos são células que desempenham importante função na inflamação crônica, podendo tanto perpetuar a lesão tecidual ao liberar produtos degradadores de tecidos e atrair neutrófilos, como promover o reparo tecidual, modulando a resposta inflamatória ao atrair linfócitos, fibroblastos e organizando o granuloma, o que provavelmente ocorreu neste trabalho, à medida que a Nimesulida modula a função deletéria dessas células ao diminuir a produção de ROS, LTB<sub>4</sub> e PAF<sup>12,16,18</sup>.

Araujo<sup>2</sup> (2011) mostrou, inclusive, que alguns produtos anti-inflamatórios são capazes de converter o granuloma de corpo estranho típico em granuloma imune. A análise histológica do granuloma poderá esclarecer, em estudos futuros, se a Nimesulida pode modular a inflamação granulomatosa nesse sentido.

Esses resultados sugerem, como propuseram Rainsford<sup>16</sup> (2006) e Süleyman<sup>20</sup> et al (2008), ser a Nimesulida um AINE atípico, por apresentar mecanismos de ação diferenciados dos já largamente conhecidos para essa classe de drogas e que podem interferir na quimiotaxia, ativação e proliferação celulares, e na não permissividade seletiva do endotélio vascular à migração transendotelial de tipos celulares específicos, como os neutrófilos.

Para análise do efeito sistêmico da Nimesulida sobre as células do sistema imune, verificou-se a dinâmica celular na cavidade peritoneal, em órgãos linfóides e no sangue. Nos animais do presente estudo, não havia estímulo inflamatório na cavidade peritoneal e se observou diminuição

significativa da celularidade da cavidade nos animais tratados com Nimesulida, mantendo-se o padrão de proporcionalidade dos tipos celulares em relação ao grupo Controle. Isso sugere que os leucócitos sanguíneos migraram preferencialmente para o granuloma e não para a cavidade peritoneal, um espaço sensível à dinâmica celular sanguínea, com uma população celular constituída predominantemente por macrófagos e que quando de processos inflamatórios locais recebe um infiltrado rico em neutrófilos, marcando o processo conhecido como peritonite. Quando da ausência de estímulo na cavidade, o organismo ocupa-se basicamente da manutenção da renovação de seus fagócitos mononucleares residentes<sup>6,7,14</sup>.

O tratamento com Nimesulida causou diminuição do número de células no baço e linfonodo mesentérico, um marcador de efetividade anti inflamatória inibidora de proliferação/recrutamento celular em órgãos linfóides secundários<sup>6,7,13</sup>, enquanto no sangue e medula óssea verificou-se aumento na contagem de células. Na contagem diferencial de leucócitos no sangue, houve aumento significativo de linfócitos, diminuição de monócitos e não se verificou diferença na contagem de neutrófilos em relação ao grupo Controle.

A redução na contagem de células no baço e linfonodo mesentérico nos animais tratados com Nimesulida provavelmente se deu pela diminuição dos linfócitos nesses órgãos. E isso pode ter sido produzido por sua migração para o foco inflamatório, recrutados pelos macrófagos presentes no granuloma. Assim, na tentativa de repor a população celular nos órgãos linfóides secundários, o aumento de células verificado na medula pode estar associado aos linfócitos, que liberados, produziram o aumento significativo na contagem de linfócitos sanguíneos nos animais tratados com Nimesulida.

O tratamento com Nimesulida converteu uma inflamação marcadamente aguda, rica em neutrófilos no grupo Controle, a um tecido tendendo à organização, envolvendo o corpo estranho em macrófagos. Logo, fica claro o efeito da Nimesulida sobre a fase proliferativa da inflamação quando se observa essa marcante ação da droga na modulação dos tipos celulares presentes no tecido

granulomatoso, acelerando o processo de “cronificação” do processo ao antecipar a organização do granuloma em torno do corpo estranho.

Entretanto, a atividade das células presentes no granuloma é questionável, bem como o mecanismo produtor da antecipação do amadurecimento do tecido. Afinal, funções propostas para explicar a atividade anti inflamatória da Nimesulida são a profunda interferência sobre a síntese e liberação de produtos inflamatórios de neutrófilos e macrófagos e a abreviação da vida de monócitos<sup>8,13,15,19</sup>. Também se deve conhecer o padrão de citocinas produzidas nos animais tratadas com Nimesulida, já que esses mediadores estão intimamente relacionados às fases mais tardias da inflamação crônica<sup>7</sup>.

É imprescindível também a análise histológica dos granulomas, o que traria com maior clareza a qualidade do infiltrado e o tipo de granuloma, dada a possibilidade de conversão entre suas modalidades induzida por tratamento com agentes anti-inflamatórios em estudo<sup>2</sup>. E ainda utilizar um modelo de granuloma de maior duração e avaliar um tratamento mais longo com o fármaco.

A Nimesulida modula de forma global o granuloma induzido por corpo estranho, agindo desde a fase exsudativa até a proliferativa. Assim, conclui-se que pode ser utilizada em experimentos que utilizem o modelo no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios, como um adequado controle positivo.

## AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CNPq, FAPEMA e CAPES pelo suporte financeiro à pesquisa e pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5ª ed. Nova Iorque: Garland Science; 2008.
2. Araujo, MAR. Estudo sobre a atividade anti-inflamatória da própolis de abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* Smith [Tese de Doutorado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2011.
3. Ashok P, Koti BC, Thippeswamy AHM, Tikare VP, Dabadi P, Viswanathaswamy AHM. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Centratherum anthelminticum* (L) kuntze seed. Indian J Pharmac Science 2010; 72: 697-703.
4. Bevilacqua M, Devogelaer JP, Righini V, Famaey JP, Manicourt DH. Effect of nimesulide on the serum levels of hyaluronan and stromelysin-1 in patients with osteoarthritis: a pilot study. Int J Clin Prac 2004; 58: 13-19.
5. Carvalho WA. Anti-inflamatórios não esteróides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In: SILVA, P. Farmacologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 2010. p. 439- 466.
6. Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. J Ethnopharmacol 2007; 111: 148-154.
7. Ferreira SCP, Frazão JB, Silva LM, Maciel MCG, Barroqueiro ESB, Azevedo APS, et al. Efeito do mesocarpo de babaçu sobre a inflamação tardia. Rev Ciênc Saúde 2004; 6: 21-28.
8. Gomez-Gaviro MV, Gonzalez-Alvaro I, Dominguez-Jimenez C, Peschon J, Black RA, Sanchez-Madrid F, et al. Structure-function relationship and role of tumor necrosis factor-alphaconverting enzyme in the down-regulation of L-selectin by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. J Biol Chem 2002; 277: 38212-38221.
9. Kalra BS, Chaturvedi S, Tayal V, Gupta U. Evaluation of gastric tolerability, antinociceptive and anti-inflammatory activity of combination NSAIDs in rats. Indian J Med 2009; 20: 418-422.

10. Karthikeyan M, Deepa MK. Anti-inflammatory activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) rottl and willd leaves extracts in Wistar albino rats. Asian Pac J Trop Med 2011; 510-513.
11. Kolaczowska E, Shahzidi S, Seljelid R, van Rooijen N, Plytycz B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. Inflammation 2002; 26: 61-71.
12. Montenegro, MR. Franco, M. Patologia: processos gerais. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999.
13. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Sekine I. Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. J Leukov Biol 2001; 69(2):241-247.
14. Pereira, WS. *Chenopodium ambrosioides* L.: avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória [Dissertação de Mestrado]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2009.
15. Rainsford KD, Bevilacqua M, Dallegri F, Gago F, Ottonello L, Sandrini G, et al. Pharmacological properties of nimesulide. 1ª ed. Basel: Birkhäuser Verlag; 2005.
16. Rainsford KD. Current status of the therapeutic uses and actions of the preferential cyclo-oxygenase-2 NSAID, nimesulide. Inflammopharmacol 2006; 14: 120-137.
17. Ribeiro BP, Pereira WS, Sousa AIP, Guerra RNM, Nascimento FRF. Alteração no perfil bioquímico induzido por reação inflamatória granulomatosa em camundongos. Rev Ciênc Saúde 2010; 12: 73-79.
18. Robbins SL, Cotran RS. Patologia: bases patológicas das doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
19. Sawada T, Hashimoto S, Tohma S, Nishimoto Y, Nagait T, Sato T, et al. Inhibition of L-leucine methyl ester mediated killing of THP-1, a human monocytic cell line, by a new anti-inflammatory drug T614. Immunopharmacol 2000; 49: 285-294.
20. Süleyman H, Cadirci E, Albayrak A, Halici Z. Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. Cur Med Chem 2008; 15: 278-283.
21. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y, Süleyman NOB. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. Pol J Pharmacol 2004; 56: 775-780.
22. Swingle KF, Shidman FE. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. J Pharmacol Exp Ther 1972; 183: 226-234.

**\*Autora para correspondência:**

Profª Dra. Flávia Nascimento

**E-mail:** nascimentofrf@yahoo.com.br