

EFEITO DO WEB 2170, UM ANTAGONISTA ESPECÍFICO DO FATOR  
ATIVADOR DE PLAQUETAS (PAF) NO TRATO REPRODUTIVO EM RATAS

Vivianne Calheiros Chaves

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FARMACOLOGIA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1990

CH39e

FC-00003201-1

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº. 626564	
03 / 03 / 97	

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Vivianne Calheiros Chaves

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / /

Prof. Vietla<sup>v</sup> / Satyanarayana Rao  
Orientador da Dissertação

Prof. Manassés / Claudino Fonteles

Prof. Francisco Manuelito Lima de Almeida

Ao meu marido Antero e  
a minha filha Larissa

Aos meus pais e irmãos

## AGRADECIMENTOS

Ao meu admirável mestre, orientador e amigo Prof. Vietla Satyanarayana Rao, pelo seu esplêndido espírito criativo e crítico na área científica, bem como, pelo apoio, dedicação e incentivo na elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Manassés Claudino Fonteles pela sua inestimável colaboração.

Ao Prof. Francisco Manuelito Lima de Almeida pela valiosas sugestões e esclarecimentos.

A César Lincoln Campelo Maia, médico amigo, pelo incentivo no campo da pesquisa científica.

Ao Dr. Hubert Hever do Boehringer Ingelheim da Alemanha pelo fornecimento da droga em estudo.

Aos colegas do mestrado pelo espírito de luta e companheirismo.

De forma especial aos amigos Célio Lima de Melo e José Clielder Rebouças da Silva que tanto me ajudaram, o meu muito obrigada.

Ao Sr. Antônio de Pádua Raposo Mazulo pela excelente orientação nos testes estatísticos.

A bibliotecária Norma Carvalho Linhares pela revisão das referências bibliográficas.

A Sra. Silvana Maria Gomes Andrade pela paciência e dedicação na execução do trabalho datilográfico.

A funcionária Nísia Rodrigues de Sousa pela ajuda nos trabalhos do laboratório.

A todos os professores, técnicos e demais

funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC que direta ou indiretamente colaboraram.

A CAPES pelo suporte financeiro que permitiu o desenvolvimento desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>A Implantação do Ovo, em Ratas</u>	1
1.2 - <u>Inflamação</u>	3
1.3 - <u>Inflamação Versus Implantação</u>	5
1.4 - <u>Fator Ativador de Plaquetas (PAF, PAF-aceter)</u>	7
1.4.1 - <u>Aspectos Reprodutivos do Fator Ativador de Plaquetas</u>	8
1.4.1.1 - <u>PAF, na Ovulação</u>	8
1.4.1.2 - <u>PAF, na Implantação do Ovo</u>	10
1.4.1.3 - <u>PAF, na Contratilidade Uterina</u>	12
1.5 - <u>Antagonistas Seletivos do PAF</u>	13
1.6 - <u>Objetivos</u>	14
2 - <u>MATERIAL</u>	16
2.1 - <u>Animais Experimentais</u>	16
2.2 - <u>Soluções Fisiológicas</u>	16
2.3 - <u>Reagentes e Corantes</u>	17
2.4 - <u>Drogas</u>	17
3 - <u>MÉTODOS</u>	19
3.1 - <u>Experimentos "in vivo"</u>	19
3.1.1 - <u>Efeito de Antagonistas Seletivos do Receptor P.A.F., BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB2170 sobre a Implantação do Ovo e Gravidez, em Ratas</u>	19
3.1.2 - <u>Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo, nos Sete Primeiros Dias da Gravidez, em Ratas</u>	20
3.1.3 - <u>Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 nos Dias 8 à 14 da Gravidez, em Ratas</u>	20



3.1.4 - Efeito do WEB 2170, em Doses Crescentes, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas.....	21
3.1.5 - Efeito de Inibidores da Fosfolipase $A_2$ , Cicloxigenase e Lipoxigenase sobre a Implantação do Ovo, em Ratas.....	22
3.1.6 - Efeito da Associação de Inibidores da Cicloxigenase, Lipoxigenase e PAF, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas.....	22
3.1.7 - Edema Inflamatório Agudo Induzido por PAF, Carragenina e Levedura de Cerveja, na Pata Direita de Ratos.....	23
3.1.7.1 - Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por PAF.....	24
3.1.7.2 - Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	26
3.1.7.3 - Efeito do WEB 2170 e EP 10161 no Edema de Pata Induzido por Levedura de Cerveja.....	26
3.1.8 - Efeito do WEB 2170 sobre o Ciclo Estral, em Ratas.....	27
3.1.9 - Efeito do WEB 2170 sobre a Atividade Uterotrópica Induzida pelo Estrógeno e nos Níveis de Fosfatase Alcalina, em Útero de Ratas Imaturas.....	27
3.2 - Experimentos " <u>in vitro</u> ".....	29
3.2.1 - Útero Isolado de Rata não Grávida.....	29
3.2.1.1 - Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina, Ocitocina, Serotonina, Cloreto de Cálcio e Cloreto de Potássio.....	29
3.2.1.2 - Efeito do WEB 2170 na Presença de Doses Crescentes de Cálcio, sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina.....	30
3.2.2 - Útero Isolado de Rata Grávida.....	31
3.2.2.1 - Efeito do WEB 2170 sobre a Atividade Espontânea de Útero Grávidico.....	31
3.2.3 - Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina em Jejuno Isolado de Rata.....	31
3.3 - Métodos Estatísticos.....	32
4 - RESULTADOS.....	33
4.1 - Experimentos " <u>in vivo</u> ".....	33
4.1.1 - Efeito de Antagonistas Seletivos do Receptor P.A.F., BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo e Gravidez, em Ratas.....	33

4.1.2	- Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo, nos Sete Primeiros Dias da Gravidez, em Ratas.	36
4.1.3	- Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 nos Dias 8 à 14 da Gravidez, em Ratas.	36
4.1.4	- Efeito do WEB 2170, em Doses Crescentes, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas.	38
4.1.5	- Efeito de Inibidores da Fosfolipase A <sub>2</sub> , Cicloxi- genase e Lipoxigenase sobre a Implantação do Ovo, em Ratas.	41
4.1.6	- Efeito da Associação de Inibidores da Cicloxige- nase, Lipoxigenase e PAF, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas	41
4.1.7	- Edema Inflamatório Agudo Induzido por PAF, Carra- genina e Levedura de Cerveja, na Pata Direita de Ratos.	45
4.1.7.1	- Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por PAF.	45
4.1.7.2	- Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por Carragenina.	45
4.1.7.3	- Efeito do WEB 2170 e EP 10161 no Edema de Pata Induzido por Levedura de Cerveja.	47
4.1.8	- Efeito do WEB 2170 sobre o Ciclo Estral, em Ratas	47
4.1.9	- Efeito do WEB 2170 sobre a Atividade Uterotrópica Induzida pelo Estrógeno e nos Níveis de Fosfatase Alcalina, em útero de Ratas Imaturas.	51
4.2	- <u>Experimentos "in vitro"</u>	54
4.2.1	- Útero Isolado de Rata não Grávida.	54
4.2.1.1	- Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzi- das por Acetilcolina, Ocitocina, Serotonina, Cloreto de Bário e Cloreto de Potássio.	54
4.2.1.2	- Efeito do WEB 2170 na Presença de Doses Cres- centes de Cálcio, sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina	57
4.2.2	- Útero Isolado de Rata Grávida	57
4.2.3	- Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina em Jejuno Isolado de Rata	63
5	- <u>DISCUSSÃO</u>	66
6	- <u>CONCLUSÕES</u>	79
7	- <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Pagina
1	Efeito de antagonistas seletivos do PAF, BNS2021, RP48740, WEB 2086 e WEB 2071 sobre a implantação do ovo e gravidez em ratas.	34
2	Efeito do tratamento com o WEB 2086 e WEB 2071 sobre a implantação do ovo e gravidez em ratas	37
3	Efeito do WEB 2170, em doses crescentes, sobre a implantação do ovo e gravidez, em ratas	40
4	Efeito do tratamento com inibidores da fosfolipase A <sub>2</sub> , cicloxigenase e lipoxigenase sobre a implantação do ovo, em ratas	42
5	Potência do WEB 2170 comparada à da indometacina, EP 10161 e dexametasona na implantação do ovo em ratas	43
6	Efeito da associação de inibidores da cicloxigenase, lipoxigenase e PAF sobre a implantação do ovo, em ratas	44
7	Efeito do WEB 2170 e indometacina no edema de pata induzido por PAF, em ratos	46
8	Efeito do WEB 2170 e indometacina no edema de pata induzido por carragenina, em ratos	48
9	Efeito do WEB 2170 e EP 10161 no edema de pata induzido por levedura de cerveja, em ratos	49
10	Efeito do WEB 2170 no edema de pata induzido por PAF, carragenina e levedura de cerveja, em ratos	50

11	Efeito do WEB 2170 sobre o ciclo estral, em ratas.	52
12	Efeito do WEB 2170 sobre a atividade induzida pelo estrógeno e nos níveis de fosfatase alcalina, em útero de ratas imaturas.	53
13	Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por agonistas, em útero isolado de rata não grávida.	58
14	Efeito do WEB sobre as contrações induzidas por acetilcolina ( $1.1 \times 10^{-6}M$ ) em jejuno e útero isolados de rata.	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura do PAF e seus antagonistas estudados (BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170)	15
2	Pletismógrafo	25
3	Efeito dos antagonistas do PAF (WEB 2086 e WEB 2170) sobre a gravidez em ratas tratadas do 4º ao 6º dia da gestação	35
4	Efeito do WEB 2170 sobre a gravidez, em ratas tratadas do 8º ao 14º dia da gravidez	39
5	Efeito do WEB 2170 sobre a atividade uterotrópica induzida pelo estrógeno em útero de ratas imaturas	55
6	Efeito do WEB 2170 nos níveis de fosfatase alcalina em útero de ratas imaturas	56
7	Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por acetilcolina em útero isolado de rata não grávida	59
8	Concentração do WEB 2170 (ug/ml) necessária para inibir 50% (IC <sub>50</sub> ) das respostas contráteis à acetilcolina, serotonina, ocitocina, cloreto de bário e cloreto de potássio em útero de rata não grávida	60
9	Efeito do WEB 2170 na presença de doses crescentes de cálcio sobre as contrações induzidas por acetilcolina em útero isolado de rata não grávida	61

10	Efeito do WEB 2170 sobre as contrações espontâneas em útero de rata grávida	62
11	Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por acetilcolina em jejuno isolado de rata	65

## RESUMO

Estudos para apoiar o papel do fator ativador de plaquetas (PAF) na reprodução foram feitos utilizando um antagonista específico do receptor-PAF, o WEB 2170.

O tratamento com o WEB 2170 durante o período peri-implantação, inibiu significativamente a implantação do ovo em ratas, numa dose variando de 1 a 10mg/Kg, i.p. A gravidez nestes animais foi bloqueada em 33,3%, 50% e 66,6% nas doses respectivas de 1; 5 e 10mg/Kg. Entretanto, na dose de 20mg/Kg não foi evidenciado aumento na inibição da gravidez. Nenhuma diferença na inibição da gravidez foi observada quando o tratamento com o WEB 2170 foi realizado nos dias 4 a 6 ou nos dias 1 a 7 da gestação indicando provavelmente o efeito da droga no processo de nidacão.

A dose de 5mg/Kg do WEB 2170 que inibiu a gravidez em 50% foi também responsável pela supressão mais intensa do edema de pata de ratos induzido por PAF-aceter do que por carragenina ou levedura de cerveja indicando sua especificidade para bloquear o receptor-PAF.

Várias outras drogas com atividade antiinflamatórias tais como dexametasona (inibidor da fosfolipase  $A_2$ ), EP 10161 (inibidor da lipoxigenase) e indometacina (inibidor da ciclo-xigenase) foram também capazes de inibir a gravidez de maneira similar ao WEB 2170. Entretanto, a potência do WEB 2170 em inibir a implantação do ovo não aumentou, quando associado com inibidores da síntese dos eicosanóides. Essas observações revelam a importância do processo inflamatório na nidacão e

também levantam a possibilidade do PAF mediar seus efeitos através da liberação de eicosanóides.

O WEB 2170 administrado às ratas grávidas nos dias 8 a 14, na dose de 5mg/Kg, i.p. afetou a organogênese causando reabsorções fetais. O antagonista do PAF em estudo, não influenciou a ação uterotrópica induzida por estrógeno em ratas imaturas. Isto sugere que o PAF não apresenta atividade estrogênica ou anti-estrogênica. A administração do WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) por 10 dias consecutivos à ratas apresentando ciclos estrais normais reduziu a incidência da fase estro e prolongou a fase diestro do ciclo reprodutivo. Ciclos normais foram, entretanto, restaurados dentro de vinte dias após o término do tratamento.

O WEB 2170 produziu inibição significativa das contrações induzidas por diferentes agonistas em útero de rata não grávida, "in vitro", bem como, inibiu a atividade rítmica espontânea de útero de rata grávida. A sua IC<sub>50</sub> (MÉDIA ± EP) para vários agonistas estudados como acetilcolina, serotonina, ocitocina, cloreto de bário e cloreto de potássio foi de 0,17 ± 0,02µg/ml; 0,53 ± 0,04µg/ml; 0,29 ± 0,03µg/ml; 0,28 ± 0,03µg/ml e 0,28 ± 0,02µg/ml, respectivamente. O efeito inibitório do WEB 2170 sobre as contrações uterinas foi dependente da concentração do íon cálcio no líquido nutritivo. Um aumento de quatro vezes na concentração do cálcio no líquido nutritivo, reverteu completamente o efeito inibitório do WEB 2170 nas contrações uterinas induzidas por acetilcolina. As contrações induzidas por acetilcolina em jejuno isolado de rata não foram significativamente inibidas pelo WEB 2170, indicando uma seletividade maior deste composto para a musculatura lisa uterina.



Este estudo mostrou que o WEB 2170 inibiu a implantação do ovo, prejudicou o desenvolvimento fetal e diminuiu a contratilidade uterina, efeitos estes que poderiam ser mediados via antagonismo do PAF, o qual pode estar envolvido no processo fisiológico associado ao ciclo estral e gravidez

## ABSTRACT

Evidence to support a role for platelet activating factor (PAF) in reproduction was provided through studies with the specific PAF-receptor antagonist, WEB 2170. Treatment with WEB 2170 during peri-implantation period, significantly inhibited ovoimplantation in rats at a dose range of 1 to 10mg/Kg, i p. Pregnancy in these rats was interrupted by 33.3%, 50% and 66.6% for the respective doses of 1, 5 and 10mg/Kg. However, the dose of 20mg/Kg did not evidence a further increase in the pregnancy inhibition. No difference in the inhibitions of pregnancy was observed whether WEB 2170 treatment was given on days 4 to 6 or on days 1 to 7 indicating the likely effect of the drug on nidation process.

The dose of 5mg/Kg WEB 2170 that inhibited pregnancy by 50% was also found to suppress more profoundly the PAF-induced rather than carrageenan or Brewer's yeast-induced edema in the hind paw of rats indicating its specificity to block the PAF-receptor. Several other drugs of anti-inflammatory nature such as dexametasone (phospholipase  $A_2$  inhibitor), EP 10161 (lipoxigenase inhibitor) and indomethacin (cicloxygenase inhibitor) were also found to inhibit pregnancy in a manner similar to that of WEB 2170. Nevertheless, the inhibitory potency of WEB 2170 on ovoimplantation was not enhanced when combined with eicosanoid synthesis inhibitors. These observations reflected the importance of inflammatory process in ovoimplantation and

also leave the possibility of PAF mediating its effect through the liberation of eicosanoids.

WEB 2170 administered to pregnant rats on days 8 to 14, in a dose of 5mg/kg, i.p. affected organogenesis and promoted fetal resorptions. The PAF antagonist under study did not influence the uterotrophic action of exogenous estrogen in immature rats. It suggests that WEB 2170 possess neither estrogenic nor antiestrogenic property. In regularly cycling rats, administration of WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) for 10 consecutive days, reduced the incidence of estrus and prolonged the diestrus phase of the reproductive cycle. Normal cycles were, however, restored within 20 days following the cessation of treatment.

WEB 2170 produced significant inhibition of spontaneous rhythmic activity of pregnant rat uterus as well as drug induced contractions of nonpregnant rat uterus in vitro. Its  $IC_{50}$  (MEAN  $\pm$  SE) concentration for various agonists, such as, acetylcholine, serotonin, oxytocin, barium chloride and potassium chloride were found to be in the order of  $0.17 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ ;  $0.53 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ ;  $0.29 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ ;  $0.28 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$  and  $0.28 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$  respectively. The inhibitory effect of WEB 2170 was found to be dependent on the concentration of calcium ion in the surrounding medium. A four fold increase in  $Ca^{++}$  concentration in the bathing fluid completely reversed the inhibitory effect of WEB 2170 on acetylcholine-induced contractions. The acetylcholine-induced contractions of rat jejunum were only insignificantly inhibited by WEB 2170. It implies that the PAF antagonist possess high selectivity for the uterine smooth muscle.

In conclusion, this study has shown that WEB 2170

inhibit ovoimplantation, impairs fetal growth and suppresses uterine contractility. These effects could be mediated via the antagonism of the drug to PAF which may be involved in the physiologic processes associated with estrous cycle and pregnancy

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - A Implantação do Ovo, em Ratas

Em ratas, a ovulação ocorre espontaneamente e está sob controle do eixo hipotálamo-hipofisário. O início da gravidez, já é considerado, no momento da ovulação, quando os espermatozóides presentes no local de fertilização encontram o óvulo liberado do folículo (ODOR & BLANDAU, 1951).

Após a fecundação (fusão dos dois pronúcleos) iniciam-se as divisões celulares sucessivas, adquirindo o embrião o estágio de duas células nos dois primeiros dias de gravidez, estágio de quatro células no terceiro dia, estágio de catorze a dezesseis células no quarto dia para finalmente formar o blastocisto ou blástula por volta do quinto dia da gravidez. Na tarde do quinto dia ou na manhã do sexto ocorre a implantação do blastocisto no endométrio (PSYCHOYOS, 1960a).

A presença de estrógeno e progesterona secretados de maneira sequenciada se faz necessária para a sensibilização do endométrio com subsequente resposta à estímulos decidualogênicos (PSYCHOYOS, 1966; DEY & JOHNSON, 1980). Antes da ovulação, o útero parece ser sensibilizado pelo estrógeno, sofre ação da progesterona durante os primeiros quatro dias da gravidez e em seguida o estrógeno é novamente necessário para que ocorra mudanças endométriais que facilitem à nidadação (FINN, 1983; HEARN, 1986)

No quinto dia da gravidez o endométrio está sensibilizado suficientemente para permitir a diferenciação das células do estroma uterino em células decíduais (reação da célula decidual, decidualização) evento crucial para o estabelecimento da implantação do ovo.

O mecanismo exato a nível celular responsável pela sensibilização uterina e subsequente decidualização ainda não foi esclarecido. Uma variedade de estímulos mecânicos, imunológicos e/ou químicos são capazes de induzir decidualização. A presença do blastocisto no útero pode funcionar como um ou mais destes estímulos (FINN, 1986).

O fator responsável pela iniciação da reação da célula decidual, em ratos, foi atribuído inicialmente a histamina (SHELESNYAK, 1952) que quando injetada no lúmen uterino induzia maciça decidualização. A hipótese do papel específico e único da histamina como indutor da reação decidual desapareceu quando várias outras substâncias induziram decidualização quando injetadas no lúmen uterino como serotonina (PSYCHOYOS, 1960a), bradicinina (De FED, 1963), prostaglandinas (CASTRACANE et al, 1974; SANANES et al, 1976), leucotrienos (SAGRILLO et al, 1987), fator ativador de plaquetas (ACKER et al, 1989), além de outros estímulos artificiais inespecíficos como óleo, soluções isotônicas e etc.

A reação da célula decidual é complexa e envolve interações entre endométrio e embrião, mudanças no sistema vascular uterino, crescimento e diferenciação das células estromáticas bem como outras alterações (KENNEDY, 1986).

Entretanto, independente do estímulo, o aumento da permeabilidade vascular uterina parece ser condição "sine qua non" para a decidualização (PSYCHOYOS, 1960b).

## 1.2 - Inflamação

Os seres humanos devem à inflamação sua capacidade de destruir, diluir ou isolar os agentes lesivos.

Estímulos físicos, químicos ou biológicos de intensidade suficientes poderão provocar lesão tecidual cuja resposta do hospedeiro à lesão manifesta-se por alterações hemodinâmicas, resultando em vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular com exsudação de proteínas plasmáticas e finalmente acúmulo de leucócitos na área lesada.

Qualquer que seja a natureza da lesão, a reação inflamatória resultante, assume um aspecto uniforme, quase estereotipado. Partindo-se desta reação estereotipada, surgiu a idéia da resposta inflamatória ser mediada pela liberação de substâncias ativas, mobilizadas endogenamente, chamadas de "mediadores químicos" da inflamação (LEME, 1981).

Estes, podem originar-se do plasma, de células ou possivelmente dos tecidos lesados e incluem: aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteases plasmáticas (o sistema de cininas, bradicinina e calicreina; o sistema de complemento,  $C_3a$ ,  $C_5$ ,  $C_5b-C_9$ ; o sistema coagulação-fibrinolítico, fibrino-peptídeos, produtos da degradação da fibrina), metabólitos do ácido aracdônico (via da cicloxigenase, prostaglandinas e tromboxanos; via da lipoxigenase, derivados hidroperóxidos e leucotrienos; via não enzimática), constituintes lisossômicos, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas (PAF), linfocinas e outros.

A mobilização e ativação destes mediadores químicos

são responsáveis pelas alterações hemodinâmicas e eventos celulares que ocorrem no processo inflamatório em resposta ao agente lesivo e que culminam na destruição, diluição ou isolamento deste agente.

A inflamação portanto, não é um evento meramente local. Um alto grau de complexidade a acompanha e a desenvolve. Dependendo da intensidade e persistência do estímulo nóxico ela pode assumir caráter benéfico com eliminação do agente lesivo ou maléfico com sequelas progressivas, destrutivas e danosas para o organismo.

Ela é influenciada por defesas naturais do hospedeiro, por circunstâncias que afetam o organismo como um todo (desnutrição, disfunções hormonais, hematológicas, etc) e por mecanismos autorregulatórios. Estes, são decorrentes da ativação ou inativação de sistemas ou fatores chamados de "moduladores da resposta inflamatória". Sem o mecanismo de autocontrole exercido pelo organismo, a inflamação nunca cessaria e permaneceríamos congestionados e edemaciados (ROBBINS & COTRAN, 1983).

A inflamação é portanto caracterizada por uma cadeia complexa de eventos onde as manifestações locais são apenas parte deste evento. É uma resposta multimediada e multimodulada do organismo contra as lesões (LEME, 1981) onde moduladores nervosos, hormonais e neuroendócrinos influenciam esta resposta.



### 1.3 - Inflamação Versus Implantação

Uma importante similaridade entre implantação e inflamação foi demonstrada, em ratos, por PSYCHOYOS (1960b)

A primeira resposta à um estímulo inflamatório é um aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade dos vasos na área lesada, resultando em edema tecidual.

Na fase inicial da implantação às primeiras mudanças visíveis são um aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade dos vasos nas áreas endometriais contendo o blastocisto (PSYCHOYOS, 1960b).

Juntamente com as alterações vasculares, mudanças celulares similares as que ocorrem na inflamação foram descritas no útero durante a implantação. Um infiltrado de células inflamatórias incluindo mastócitos (BRADON & BIBBY, 1979), leucócitos polimorfonucleares (ENDERS & SCHAFKE, 1979) e macrófagos (ENDERS et al, 1985) foi encontrado no estroma uterino no sítio de implantação.

Baseado nestas mudanças vasculares e celulares a nidadação foi comparada a uma reação inflamatória transitória local (MALATHY et al, 1986; TAWFIK et al, 1987) envolvendo vários mediadores inflamatórios incluindo histamina (KRAICER & SHELESNYAK, 1958), serotonina (PSYCHOYOS, 1960b), prostaglandinas (PHILLIPS & POYSER, 1981) e mais recentemente leucotrienos (MALATHY et al, 1986) e PAF aceter (ACKER et al, 1989).

Os macrófagos residentes, células endoteliais e várias células sanguíneas podem interagir entre si através de citocinas e contribuir para a liberação local desses media-

dores inflamatórios. A liberação desses mediadores pode ser desencadeada por estímulo mecânico (presença do embrião) e/ou estímulo hormonal específico. Sabe-se que o estrógeno degrana mastócitos e também induz ativação da fosfolipase  $A_2$  no útero (SAKSENA et al, 1976). A ativação da fosfolipase  $A_2$  resulta em liberação de ácido aracdônico livre e liso-PAF de membranas lipídicas. Uma vez liberado, o ácido aracdônico é rapidamente metabolizado por enzimas intracelulares (cicloxi- genase e lipoxigenase) em vários produtos biologicamente ati- vos conhecidos como eicosanóides (prostaglandinas e leuco- trienos). O liso-PAF é convertido em PAF, composto biologica- mente ativo

Tanto o endométrio como o blastocisto podem liberar, em cascata, mediadores inflamatórios e outros fatores respon- sáveis pelo aumento da permeabilidade vascular endometrial e indução da decidualização resultando na efetiva implantação do ovo.

#### 1.4 - Fator Ativador de Plaquetas (PAF, PAF-aceter)

O fator ativador de plaquetas (PAF, PAF-aceter), FIGURA 1, foi inicialmente descrito como produto derivado de basófilos de coelho sensibilizado pela imunoglobulina E capaz de agregar plaquetas (BENVENISTE et al, 1972). É conhecido como 1-O-alkuil-2(R)-acetil-glicero-3 fosforilcolina (DEMON- POULOUS et al, 1979; BENVENISTE et al, 1979b) mediador fosfo- lipídico formado por diferentes tipos celulares incluindo leucócitos (CAMUSSI et al, 1981), macrófagos (BENVENISTE et

al, 1979a), células endoteliais (CAMUSSI et al, 1983) e plaquetas (CHIGNARD et al, 1979) após estímulo imunológico e não imunológico.

Está presente nas células como precursor 1-O-alkil-2(R) acil-glicero-3-fosfatidilcolina (Alquil-acil-G.P.C.) e sua formação envolve duas vias sintéticas (VARGAFTIG et al, 1980): (1) Ativação da fosfolipase  $A_2$  com desacilação do alquil-acil-G.P.C. dando como produto o liso-PAF que possui propriedades físicoquímicas similares ao PAF mas é biologicamente inativo. (2) Acetilação do liso-PAF pela enzima acetiltransferase para formar o PAF que é biologicamente ativo (VARGAFTIG et al, 1981). Ambas as enzimas envolvidas na formação do PAF são dependentes do cálcio.

A inativação do PAF é efetuada pela acetilhidrolase e acetiltransferase. A acetilhidrolase converte o PAF em liso-PAF, pela remoção do grupo acetil da posição 2(R).

Ela está presente tanto no meio intra como extra-celular. A forma intracelular é encontrada na fração citosólica de várias células e tecidos e é resistente à ação de proteases. A acetiltransferase através do sistema de acilação transforma o liso-PAF no precursor inicial alquilacil-G.P.C.

O liso-PAF exógeno é convertido principalmente em alquilacil-G.P.C. e uma pequena quantidade em PAF devido a acetiltransferase ter uma maior afinidade pelo liso-PAF e/ou maior velocidade de reação do que a acetiltransferase (BRAQUET et al, 1987).

Estudos anteriores demonstraram que o alquilacil-G.P.C. tanto é precursor do PAF, como uma importante origem de ácido aracônico (A.A.), sendo este um dos maiores ácidos graxos incorporados ao precursor inicial. Portanto, o ciclo

de desacilação-reacilação pode realizar um importante papel na regulação celular ativando células e liberando PAF e A.A através de um mecanismo comum (desacilação) seguido pela inativação (reacilação), retornando às células aos seus estados inativos.

Os efeitos do PAF são marcadamente dependentes da espécie animal e da sua via de administração. A injeção endovenosa do PAF em espécies animais diferentes é seguida por efeitos sistêmicos distintos: hipotensão (ratos, cobaia, coelho e etc); hipertensão pulmonar (coelhos); aumento da resistência das vias aéreas (cobaia), aumento da permeabilidade vascular (ratos e cobaias), trombocitopenia, neutropenia e morte em algumas espécies animais.

O PAF está envolvido em inúmeras condições fisiopatológicas incluindo trombose arterial, choque endotóxico, asma, isquemia miocárdica e cerebral, doenças renais, imunológicas e numa variedade de doenças inflamatórias (BRAQUET et al, 1987; PIROTZSKY & BRAQUET, 1988; ACKER et al, 1989; SPINKS et al, 1989).

#### 1.4.1 - Aspectos Reprodutivos do Fator Ativador de Plaquetas

##### 1.4.1.1 - PAF, na Ovulação

No ovário, mudanças sequenciadas na maturação do folículo de "Graff" culminam com a ruptura do folículo e liberação do óvulo (DAPHNA-IKEN et al, -1989).

Atenção tem sido dada recentemente, às alterações bioquímicas que levam à ruptura folicular. O papel essencial da proteólise na ovulação, sugerida por SHOCHET (1916) tem sido confirmado baseado na evidência da participação da cascata proteolítica (MORALES et al, 1983; TSAFRIRI et al, 1989) envolvendo o fator ativador de plasminogênio tecidual, plasmina e colagenase culminando na degradação do colágeno (colagenólise) e contribuindo para a ruptura do folículo.

Na ovulação, observou-se um aumento da permeabilidade vascular seguido de hiperemia e edema do tecido ovariano além de um infiltrado de células inflamatórias locais. Baseado na similaridade entre ovulação e inflamação (ESPEY, 1980) levantou-se a possibilidade do envolvimento do PAF na ovulação (ABISOGUN et al, 1989)

O tratamento com antagonistas seletivos do receptor-PAF administrados localmente no ovário, durante o período pré-ovulatório, em ratas, confirmou a ação do PAF como bloqueador da ovulação em resposta à estímulo gonadotrófico exógeno (DAPHNA-IKEN et al, 1989). Antagonistas do PAF foram capazes de inibir a colagenólise ovariana e a permeabilidade vascular eventos que precedem a ruptura do folículo

A origem celular primária e o "alvo" da ação do PAF na ovulação ainda não foram esclarecidos. Supõe-se que o PAF exerça seus efeitos por induzir a marginação e a ativação de trombócitos e leucócitos in vivo e in vitro. Os neutrófilos contém proteases que degradam a "matriz" folicular e aumentam a permeabilidade epitelial (MILKS et al, 1986) favorecendo a ovulação. É possível também que a ação do PAF seja mediada via eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos). O pico de LH pré-ovulatório estimula a colagenólise

ovariana, a cicloxigenase, lipoxigenase e aumenta o fluxo sanguíneo ovariano. O aumento da colagenólise ovariana e permeabilidade vascular parecem ser mediadas por produtos da cicloxigenase (prostaglandinas), lipoxigenase (leucotrienos) e PAF.

Portanto, o PAF parece atuar na ovulação, via eicosanóides, provavelmente envolvendo leucócitos.

#### 1.4.1.2 - PAF, na Implantação do Ovo

O PAF pode ser o 1º sinal fisiológico produzido pelo embrião para o reconhecimento materno da gravidez. Está presente no líquido amniótico humano (BILLAH et al, 1985) e as enzimas envolvidas no seu metabolismo foram encontradas no tecido amniótico (BAN et al, 1986) onde o PAF foi sintetizado.

A produção de PAF por embriões foi descrita inicialmente por O'NEILL (1985) que observou uma redução na contagem de plaquetas nas primeiras horas após a fertilização do ovo, em camundongos. Esta trombocitopenia foi também produzida pela injeção intra-peritoneal, em camundongos esplenectomizados, do meio de cultura de embriões produzidos nas fertilizações "in vitro" (SPINKS et al, 1989) confirmando a produção do PAF pelo embrião.

O potencial da gravidez, nas transferências de embriões nas fertilizações "in vitro", tem sido correlacionado com a produção de PAF pelo embrião, sugerindo o papel do PAF no estabelecimento da gravidez.

A nível embrionário, o PAF foi capaz de estimular o catabolismo de carboidratos (lactato e glicose) aumentando a produção de  $CO_2$ , podendo este, ser usado como marcador para a viabilidade do embrião nas fertilizações "in vitro". O aumento no metabolismo dos carboidratos demonstrou um efeito directo do PAF no desenvolvimento embrionário.

A nível uterino, o PAF derivado do embrião realiza um importante papel na nidacão.

Em ratos, como em outras espécies de mamíferos, a implantação do ovo é precedida por um aumento da permeabilidade vascular endometrial nas áreas contendo o blastocisto (PSYCHOYOS, 1960b) facilitando a decidualização. O PAF exhibe propriedades vasoativas e quando injetado nas proximidades da microvasculatura, causa um aumento da permeabilidade vascular (ARCHER et al, 1987), edema (CORDEIRO et al, 1987) e activação plaquetária. ACKER (1988) demonstrou que o PAF injetado intra-útero, em ratas sensibilizadas pelos hormônios da gravidez, induzia decidualização, reacção essencial para a implantação do ovo.

O início da gravidez lembra uma resposta inflamatória, sugerindo o papel do mediador inflamatório PAF, na implantação. É bem conhecido que as plaquetas contêm vários factores de crescimento: factor de crescimento derivado de plaquetas (P.D.G.F.), factor activador de tecido conectivo; factores de crescimento e promotores de adesão semelhantes a fibronectina. Quando activadas, por acção do PAF, liberam estes factores, podendo mediar a adesão, crescimento e invasão do trofoblasto na parede uterina durante a implantação do embrião.

Juntamente com o PAF derivado do embrião há relatos

de produção uterina de PAF (YASUDA et al, 1986), influenciando a gestação.

Os níveis de PAF intra-útero estão aumentados no início da gravidez, alcançam um pico no quarto dia (período pré-implantação) e retornam ao normal por volta do sétimo dia (ANGLE et al, 1986).

Além do PAF, outros mediadores inflamatórios têm sido implicados como iniciadores da reação decidual. O PAF é capaz de induzir a secreção de prostaglandinas e leucotrienos em vários tipos celulares e tecidos (KENNEDY, 1977) e estes apresentam também propriedades vasoativas influenciando as respostas deciduais que precedem a implantação do ovo (ACKER et al, 1988).

A preparação uterina para a nidadação, envolve portanto, uma cascata de mediadores químicos.

O papel do PAF no processo reprodutivo, em roedores, só foi confirmado após o uso de antagonistas seletivos do PAF, administrados durante o período pré-implantação, capazes de inibir a nidadação.

#### 1.4.1.3 - PAF, na Contratilidade Uterina

Poucos são os trabalhos mostrando os efeitos do PAF, na contratilidade uterina.

MONTRUCHIO et al (1986) mostrou que o PAF é capaz de contrair úteros isolados de cobaias grávidas e não grávidas, atribuindo este efeito à produção de eicosanóides. MEDEIROS & CALIXTO (1989) demonstraram que o PAF também afeta a reativi-



dade uterina por induzir respostas contráteis em úteros isolados de rata grávida e não grávida.

Não se sabe porém, se o PAF atua diretamente no miométrio via receptor específico ou indiretamente através da estimulação da síntese de eicosanóides. Talvez ele possa influenciar na reprodução por regular a contratilidade uterina

### 1.5 - Antagonistas Seletivos do PAF-aceter

Somente com a descoberta e extração de inibidores específicos do PAF foi possível estabelecer o seu papel em várias condições fisiopatológicas. Três classes diferentes de antagonistas seletivos do PAF foram descritas: (1) Análogos do PAF com marcada propriedade antagonista: CV3988; R0193704, SRI63441 e compostos derivados, etc. (2) Produtos naturais incluindo os terpenóides (Ginkgolides BN 52020, BN 52021, BN 52023, BN 52024 e outros) e o lignan Kadsurenone ou derivados de produtos naturais semelhantes ao neo-lignan L 652.731. (3) Compostos sintéticos incluindo o RP 48740 e os hetrazepínicos (WEB 2086 e WEB 2170), além de outros compostos recentemente sintetizados.

Alguns destes compostos têm sido utilizados por vários pesquisadores para estabelecer o papel de PAF no processo reprodutivo, tais como, ovulação, implantação do ovo e gravidez. Dos trabalhos realizados anteriormente, nenhuma conclusão definitiva pôde ser feita, por consequência de tais estudos terem sido realizados em espécies diferentes, empregando antagonistas do PAF com estruturas químicas diversas,

esquemas de dosagem e via de administração distintas e sob condições experimentais variadas.

Para esclarecer a função do PAF no processo reprodutivo, o presente trabalho utilizou um potente antagonista seletivo do receptor-PAF, o WEB 2170, sintetizado recentemente, com os objetivos abaixo mencionados

#### 1.6 - Objetivos

(1) Observar os efeitos do antagonismo do PAF na implantação do ovo, organogênese fetal e contratilidade uterina

(2) Verificar se há relação dose resposta no efeito produzido pelo WEB 2170, na nidadação.

(3) Comparar os efeitos do WEB 2170 com drogas com atividade antiinflamatória, na nidadação.

(4) Analisar a especificidade do WEB 2170 em antagonizar o PAF, no modelo animal de inflamação aguda, induzida por diferentes agentes flogísticos.

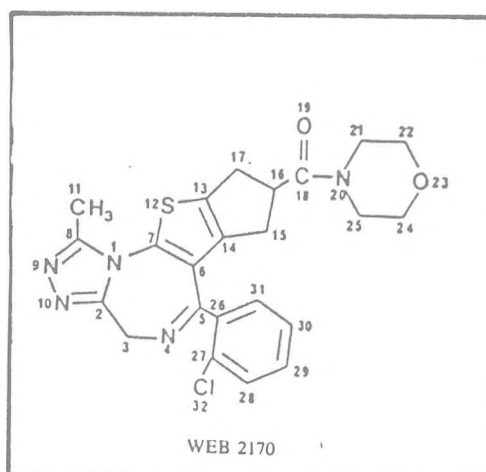
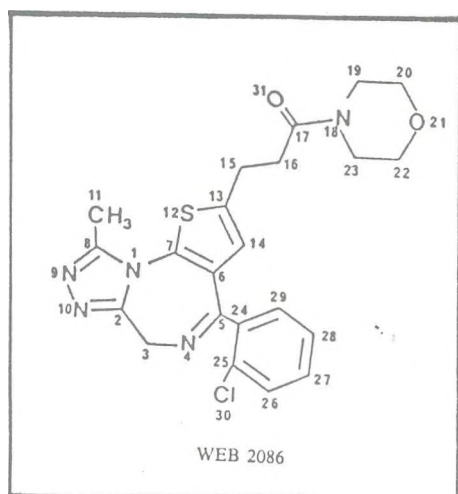
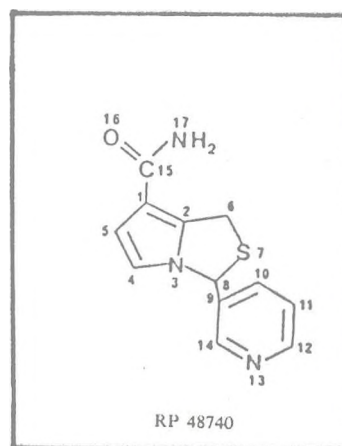
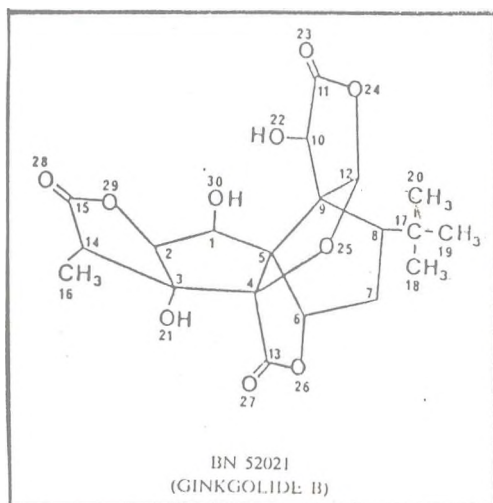
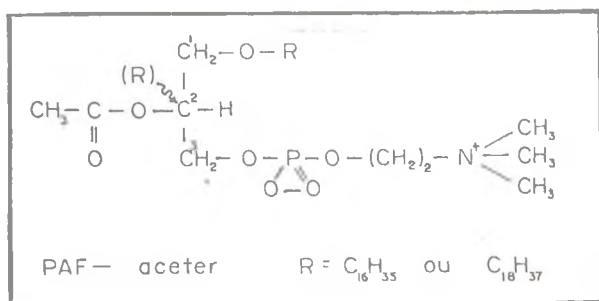


FIGURA 1 - Estrutura do PAF e seus antagonistas estudados  
(BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170)

## 2 - MATERIAL

### 2.1 - Animais Experimentais

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, de ambos os sexos, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará

Os ratos foram mantidos em condições ambientais semelhantes, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração em "pellets" (Purina) e água "ad libitum".

### 2.2 - Soluções Fisiológicas

As soluções fisiológicas foram preparadas com sais de pureza analítica (MERCK) As concentrações foram expressas em milimolar (mM).

- Solução salina

NaCl 154

- Solução de De Jalon

NaCl 154; KCl 5,3; CaCl<sub>2</sub> 0,6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3; NaHCO<sub>3</sub> 6,9; Glicose 2,7

- Solução de Tyrode

NaCl 136; KCl 2,68; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 0,92; NaHPO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; Glicose 5,5

### 2.3 - Reagentes e Corantes

- ALCOOL ETÍLICO (R.A. Prod. Químicos)
- DIMETILSULFÓXIDO (D.M.S.O.) (REAGEN)
- ÉTER ETÍLICO (REAGEN)
- GLICINA (E. MERCK)
- HIDRÓXIDO DE SÓDIO (REAGEN)
- LAURIL SULFATO DE SÓDIO (REAGEN)
- TIMOLFTALEÍNA MONOFOSFATO (SIGMA)

### 2.4 - Drogas

- Benzoato de estradiol (SIGMA)
- BN 52021 (HENRI BEAUFOUR INSTITUTE)
- Carragenina (SIGMA)
- Cloreto de acetilcolina (SIGMA)
- Cloreto de bário (REAGEN)
- Cloreto de cálcio (REAGEN)
- Cloreto de potássio (GRUPO QUÍMICA)
- Dexametasona (DECADRON - M.S.D.)
- Dietilestilbestrol (SIGMA)
- EP 10161 (HENRI BEAUFOUR INSTITUTE)
- 5-Hidroxitriptamina (SIGMA)
- Indometacinina (INDOCID - M.S.D.)
- Levedura de cerveja (MEAD JOHNSON)
- Ocitocina (CEME)
- P.A.F. (Fator Ativador de Plaquetas) (HENRI

## BEAUFOUR INSTITUTE)

- RP 48740 (RHONE-POULENC SANTÉ)
- WEB 2086 (BOEHRINGER INGELHEIM)
- WEB 2170 (BOEHRINGER INGELHEIM)

### 3 - MÉTODOS

#### 3.1 - Experimentos "in vivo"

##### 3.1.1 - Efeito de Antagonistas Seletivos do Receptor P A F BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo e Gravidez, em Ratas

Ratas Wistar (150 - 200g) de comprovada fertilidade foram acasalados com fêmeas de ciclo regular, na fase pró-estro do ciclo estral. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, visualizados por microscopia óptica, indicava o 1º dia da gravidez. Estes animais foram selecionados ao acaso em 4 grupos de 6 animais cada e 1 grupo de 10 animais. Cada grupo de 6 animais foi tratado com BN52021 (10mg/Kg, i.p.), RP48740 (10mg/Kg, i.p.), WEB2086 (10mg/Kg, i.p.) ou WEB2170 (10mg/Kg, i.p.) e o grupo de 10 animais (controle) com o veículo dimetilsulfóxido (D.M.S.O.) à 5% (2mg/Kg, i.p.) em 154mM de NaCl no qual as drogas foram suspensas ou dissolvidas. Todos os grupos foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez com as drogas acima citadas, em uma única injeção diária.

No 10º dia da gravidez, os animais foram laparotomizados sob ligeira anestesia com éter etílico e o nº de sítios de implantação nos cornos uterinos foi verificado e anotado para cada animal. A completa ausência de sítios de implantação era considerada como critério de inibição da gravidez. O abdome era fechado e esperava-se o término da gravidez,

quando então verificava-se o tempo de gestação, número de filhotes nascidos por animal e as perdas fetais em cada grupo

### 3.1.2 - Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo, nos Sete Primeiros Dias da Gravidez, em Ratas

Com a finalidade de avaliar a potência destes antagonistas do PAF no período mais precoce da gestação foram escolhidos, ao acaso, 3 grupos de 6 animais cada

O 1º grupo (controle) recebeu o veículo D.M.S.O. a 5% (2ml/Kg, i.p.) em 154mM de NaCl. o 2º, o WEB 2086 (5mg/Kg, i.p.) e o 3º, o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.).

Todos os grupos foram tratados do 1º ao 7º dia da gravidez, com as drogas acima citadas, em uma única injeção diária. No 10º dia da gravidez, as ratas foram laparotomizadas, sob ligeira anestesia com éter etílico, e o nº de sítios de implantação nos cornos uterinos foi verificado e anotado para cada animal. O abdome era fechado e esperava-se o término da gravidez, quando então, verificava-se o percentual de inibição da gravidez, tempo de gestação, nº de filhotes nascidos por animal e as perdas fetais em cada grupo

### 3.1.3 - Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 nos Dias 8 à 14 da Gravidez, em Ratas

Com o intuito de averiguar possíveis efeitos sobre a organogênese fetal, o WEB 2086 e WEB 2170 foram administrados do 8º ao 14º dia da gravidez.



Três grupos de 6 animais cada, foram escolhidos aleatoriamente. O 1º grupo foi tratado com o veículo D.M.S.O a 5% (2ml/Kg, i.p.) em 154mM de salina, o 2º, com WEB 2086 (5mg/Kg, i.p.) e o 3º, com WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.).

Esperava-se o término da gestação, quando então verificava-se o tempo de gestação e o nº de filhotes nascidos por animal.

#### 3.1.4 - Efeito do WEB 2170, em Doses Crescentes, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas

Com o objetivo de verificar se doses crescentes do WEB 2170, potencializava seu efeito anti-implantação, foram escolhidos ao acaso 4 grupos de 6 animais cada. O 1º, foi tratado com o WEB 2170 na dose de 1mg/Kg, i.p., o 2º na dose de 5mg/Kg, i.p., o 3º na dose de 10mg/Kg, i.p. e o 4º na dose de 20mg/Kg, i.p.

Todos os grupos foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez, com a droga, em uma única injeção diária.

No 10º da gravidez, realizava-se laparotomia e verificava-se o nº de sítios de implantação por rata grávida.

A completa ausência de sítios de implantação era considerada como critério de inibição da gravidez.

O mesmo procedimento foi feito com a droga, nas doses de 10mg/Kg e 20mg/Kg, por via oral.

### 3.1.5 - Efeito de Inibidores da Fosfolipase A<sub>2</sub>, Cicloxigenase e Lipoxigenase sobre a Implantação do Ovo, em Ratas

Sabendo-se que, um processo inflamatório transitório envolvendo o mediador lipídico PAF, se faz necessário para a implantação do blastocisto no útero, foi levantada a possibilidade do envolvimento de outros mediadores químicos no processo reprodutivo

Foi analisado um inibidor de cicloxigenase (Indometacina), da lipoxigenase (EP10161) e da fosfolipase A<sub>2</sub> (Dexametasona)

Três grupos de 6 animais cada foram escolhidos ao acaso. O 1º grupo foi tratado com dexametasona (0,05mg/Kg, i p.), o 2º com indometacina (5mg/Kg, p o.) e o 3º com o EO10161 (10mg/Kg, i p.), em dose única diária, do 4º ao 6º dia da gravidez. No 10º dia da gravidez, laparotomia era realizada e verificava-se o nº de implantes por rata grávida. A completa ausência de implantes era considerada como critério de inibição da gravidez

### 3.1.6 - Efeito da Associação de Inibidores da Cicloxigenase, Lipoxigenase e PAF, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas

Com o objetivo de verificar se a associação de múltiplos inibidores da resposta inflamatória, potencializava o efeito anti-implantação, foi escolhido, ao acaso, um grupo de 6 animais e tratado com um inibidor da cicloxigenase (Indometacina) na dose de 5mg/Kg, p o., um da lipoxigenase

(EP10161) na dose de 10mg/Kg, i.p., e um inibidor do PAF (WEB 2170) na dose de 5mg/Kg, i.p. Os animais foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez com as drogas, em dose única, diária. No 10º dia da gravidez, laparotomia era realizada e verificava-se o nº de implantes por rata grávida. A completa ausência de implantes era considerada como critério de inibição da gravidez.

### 3.1.7 - Edema Inflamatório Agudo Induzido por PAF, Carragenina e Levedura de Cerveja, na Pata Direita de Ratos

O WEB 2170 foi testado no modelo de edema inflamatório agudo induzido por diferentes agentes flogísticos para verificar possíveis efeitos antiinflamatórios específicos e inespecíficos.

Injetava-se o PAF, carragenina e levedura de cerveja na pata direita de ratos e verificava-se o volume da pata, por pletismógrafo, antes e após a injeção do agente flogístico.

#### Método Pletismográfico

Uma variante do método de Domenjoz (1954) descrito primeiramente por HILLBRECHT (1954) e aperfeiçoado por WINTER et al (1957) foi utilizada para fins de medida do volume das patas dos animais. O aparelho utilizado, o pletismógrafo, encontra-se representado na FIGURA 2

A pata traseira direita do animal foi estendida firmemente e introduzida até um determinado ponto de referência (borda postero-proximal da proeminência do calcanhar) em

um recipiente cheio (B) por onde o fluido desloca-se para o interior de um tubo horizontal graduado (0,01ml) (C), por intermédio do qual a leitura do volume foi registrada. O fluido utilizado foi uma solução de lauril sulfato de sódio a 0,05% em álcool etílico a 5%. Após o esvaziamento da solução e zeragem do aparelho, a torneira da extremidade (D) foi girada de modo que a abertura ao vácuo fosse fechada e o tubo graduado (C) fosse aberto à atmosfera, a pata do animal foi então imersa no vaso (B) até que o ponto de referência estivesse alinhado com o menisco do fluido visto na parede do vaso durante 2 a 4 segundos, quando então ocorreu o deslocamento do fluido, remoção da pata do animal e realização da leitura no tubo graduado (C).

### 3.1.7.1 - Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por PAF

Ratos Wistar machos pesando 120 - 150g, escolhidos aleatoriamente foram divididos em 3 grupos de 6 animais cada. O 1º grupo (controle) foi tratado com o veículo D.M.S.O. a 5% (2ml/Kg, i.p. em 154mM de salina), o 2º com o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) e o 3º com Indometacina (5mg/Kg, p.o.) uma hora antes da injeção subplantar de 0,1ml de uma solução de PAF a 0,002% na pata traseira direita.

O volume da pata foi medido por pletismógrafo antes e 2h após a injeção do agente flogístico.

A atividade anti-edematogênica das drogas foi considerada em termos de inibição percentual do edema, de acordo

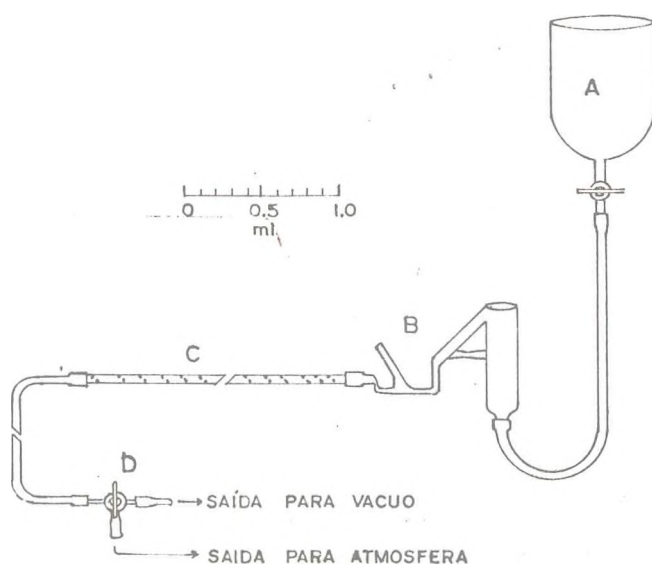


FIGURA 2 - Pletismógrafo - Aparelho utilizado para medir o volume da pata de rato A pata é imersa no vaso B enchido através do reservatório A e o líquido transborda para um tubo graduado C, onde se registra a leitura referente a alteração do volume

com a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição} = 1 - \frac{V_t}{V_c} \times 100, \text{ onde } V_t \text{ e } V_c$$

correspondem a média das diferenças entre as medidas das patas nos grupos tratados e controle respectivamente.

### 3.1.7.2 - Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por Carragenina

Ratos Wistar machos pesando 120 - 150g, escolhidos aleatoriamente foram divididos em 3 grupos de 6 animais cada

O 1º grupo (controle) foi tratado com o veículo, o 2º com o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) e o 3º com Indometacina (5mg/Kg, p.o.), uma hora antes da injeção subplantar de 0,1ml de uma solução de carragenina a 1% na pata traseira direita (WINTER et al, 1962). O volume da pata foi medido por pletismógrafo antes e 3h após a injeção do agente flogístico. A inibição percentual do edema foi calculada segundo a fórmula citada no item 3.1.7.1.

### 3.1.7.3 - Efeito do WEB 2170 e EP 10161 no Edema de Pata Induzido por Levedura de Cerveja

Ratos Wistar machos pesando 120 - 150g, escolhidos aleatoriamente foram divididos em 3 grupos de 6 animais cada. O 1º grupo (controle) foi tratado com o veículo, o 2º com o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) e o 3º com EP 10161 (10mg/Kg, i.p.), uma hora antes da injeção subplantar de 0,1ml de uma solução

de levedura de cerveja a 2,5% na pata traseira direita. O volume da pata foi medido por pletismógrafo antes e 3h após a injeção do agente flogístico. A inibição percentual do edema foi calculada de acordo com a fórmula citada no item 3.1.7.1.

### 3.1.8 - Efeito do WEB 2170 sobre o Ciclo Estral, em Ratas

Dois grupos de 5 animais cada (ratas 150 - 200g) escolhidos baseado na existência de 2 ciclos estrais consecutivos normais foram tratados com o veículo D.M.S.O a 5% (0,16ml, i.p.) ou com o WEB 2170 5mg/Kg, i.p.) por 10 dias. Durante todo este período examinava-se e anotava-se diariamente a fase do ciclo estral na qual os animais se encontravam, através da colheita da secreção vaginal e observação à microscopia óptica.

Após o término do tratamento seguia-se os animais por mais 20 dias, com o intuito de observar a persistência ou não do efeito do WEB 2170.

### 3.1.9 - Efeito do WEB 2170 sobre a Atividade Uterotrópica Induzida pelo Estrógeno e nos Níveis de Fosfatase Alcalina, em Útero de Ratas Imaturas

Neste ensaio foram utilizados 4 grupos de ratas Wistar imaturas com 28 - 30g de peso e 19 - 21 dias de idade, com 5 animais cada. O 1º grupo (controle) foi tratado com o veículo (0,1ml de óleo de milho, SC + D.M.S.O. a 5% (veículo

do WEB 2170) 0,16ml, i.p., o 2º com o estrógeno padrão (benzoato de estradiol) 0,1µg/animal, sc, o 3º com o WEB 2170 (5mg/Kg) 0,16ml, i.p. e o 4º com estrógeno padrão + WEB 2170. Todos os grupos foram tratados durante 3 dias consecutivos e no 4º dia os animais eram sacrificados por deslocamento cervical, retirados seus úteros, pesados e comparados entre os vários grupos. Foi analisado também a atividade da fosfatase alcalina em homogenato de cada útero de rata. O homogenato foi preparado adicionando-se salina e utilizando-se um micro-homogenizador para maceração do tecido.

A atividade da fosfatase alcalina foi verificada segundo o método de ROY modificado (1970) baseando-se no princípio de que a fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína que apresenta cor azul em meio alcalino.

Em três tubos marcados B (Branco), T (Teste) e P (Padrão) foi colocado em cada tubo 0,1ml do substrato (timolftaleína monofosfato) e 1ml da solução tampão (glicina 0,1M, pH = 10,5). No tubo padrão foi adicionado 0,1ml da solução padrão (fosfatase alcalina 45 /l). Todos os tubos foram incubados em banho-maria à 37°C durante 2 minutos. Após este período foi adicionado no tubo T (Teste) 0,1ml da amostra (homogenato de útero) e novamente incubados durante 10 minutos (cronometrados). Os tubos foram então retirados do banho-maria, acrescentando-se 4ml do reagente de cor (NaOH 0,02N) em cada um deles. A intensidade da coloração formada era diretamente proporcional à atividade enzimática medida em espectrofotômetro (590nm) e calculada de acordo com a fórmula:

$$U/L = \frac{\text{absorbância do teste}}{\text{absorbância do padrão}} \times 45$$



Os experimentos foram realizados em duplicata

### 3.2 - Experimentos "in vitro"

#### 3.2.1 - Útero Isolado de Rata não Grávida

Supondo-se que a contratilidade uterina pudesse interferir na implantação do ovo foi estudado o efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por vários agonistas

##### 3.2.1.1 - Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina, Ocitocina, Serotonina, Cloreto de Bário e Cloreto de Potássio

Este experimento foi realizado segundo o método de HOLTON (1948). Foram utilizadas ratas virgens (150 - 200g) mediante prévia estrogenização (18 horas) com dietilestilbestrol (0,1ml/100g de peso, sc)

Os animais eram sacrificados por meio de pancada na nuca e em seguida feita secção de seus vasos cervicais

Após serem colocados em decúbito dorsal uma incisão em forma de "V" era feita na região abdominal. A pele e a camada muscular eram rebatidas, os intestinos afastados e os cornos uterinos localizados e retirados 2 a 3cm de suas extremidades 1/3 distais do ovário e colo uterino e transferidos imediatamente para uma placa de Petri contendo a

solução nutritiva de DE JALON aerada continuamente Os tecidos foram montados em banho de perfusão para musculatura lisa adaptado a uma câmara de 10ml de capacidade contendo a solução de DE JALON, aerada e mantida à temperatura constante de 29°C.

As contrações provenientes do uso de diferentes concentrações de drogas, foram registradas em tambor móvel de quimógrafo, através de uma alavanca isotônica com uma tensão de 0,5g e amplificação de seis vezes.

O tecido permaneceu em repouso por 30 a 40 minutos para estabilização, sendo em seguida registradas respostas contráteis para acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}M$ ), 5-hidróxitriptamina ( $0,28 \times 10^{-7}M$ ), ocitocina ( $2,98 \times 10^{-12}M$ ), cloreto de bário ( $4 \times 10^{-4}M$ ) e cloreto de potássio ( $5,3 \times 10^{-2}M$ ), em intervalos de 5 minutos, antes e após a incubação com o WEB 2170 em concentrações crescentes (5 a 20  $\mu g/ml$ ) durante 3 minutos

A  $IC_{50}$  (concentração do WEB 2170 necessária para produzir 50% de inibição da resposta do agonista) foi obtida graficamente a partir da realização de 4 registros com cada agonista utilizado com o objetivo de avaliar a potência do WEB 2170 frente a cada um deles

### 3.2.1.2 - Efeito do WEB 2170 na Presença de Doses Crescentes de Cálcio, sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina

Concentrações crescentes de  $CaCl_2$  (1,2 a 4.8mM) foram utilizadas após a incubação com o WEB 2170 na dose de

20  $\mu\text{g/ml}$  por 3 minutos e antes da resposta contrátil à acetilcolina ( $0,57 \times 10^{-6}\text{M}$ )

### 3.2.2 - Útero Isolado de Rata Grávida

#### 3.2.2.1 - Efeito do WEB 2170 sobre a atividade espontânea de útero gravídico

Como objetivo de verificar se o WEB 2170 modificava as contrações espontâneas em útero gravídico, ratas Wistar, em nº de "6", foram sacrificadas no 8º dia da gravidez. Segmentos entre 2 - 3cm dos cornos uterinos foram retirados, mantidos em câmara de perfusão com capacidade para 10ml e banhados com solução nutritiva de DE JALON à 29°C. Contrações isotônicas contra um peso de 1g foram registradas em quimógrafo

As contrações espontâneas foram registradas por um período de 10 minutos sendo em seguida adicionado ao banho o WEB 2170 nas concentrações de 5 $\mu\text{g/ml}$  e depois 10 $\mu\text{g/ml}$ .

#### 3.2.3 - Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina em Jejuno Isolado de Rata

Ratas Wistar, escolhidas aleatoriamente, em número de 4, pesando 150 - 200g, foram mantidas em jejum durante 48 horas antes de serem sacrificadas. Após o sacrifício, por

meio de pancada na nuca seguida por secção de seus vasos cervicais, uma incisão em forma de "V" era feita no abdome. Um segmento de jejuno com 2,5cm de comprimento era retirado, lavado com solução nutritiva de Tyrode e montado em uma câmara de vidro contendo 10ml da solução nutritiva, aerada continuamente, à 37°C.

Após um período de estabilização de 30 a 40 minutos, o registro das respostas contráteis à acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}M$ ) foi então iniciado em intervalos de 5 minutos antes e após a incubação com o WEB 2170 em doses crescentes (5, 10 e 20 g/ml) por 3 minutos. Os registros foram efetuados em um tambor móvel de quimógrafo, através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal com uma tensão de 0,5g e uma amplificação de 6 vezes.

### 3.3 - Métodos Estatísticos

Os resultados em todos os experimentos que exigiram uma análise estatística foram expressos como MÉDIA  $\pm$  E.P. (erro padrão da média). A significância estatística foi calculada de acordo com o teste "t de Student", obedecendo aos níveis de significância de  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ .

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Experimentos "in vivo"

#### 4.1.1 - Efeito de Antagonistas Seletivos do Receptor P A F , BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Im- planta do Ovo e Gravidez, em Ratas

A TABELA 1 e a FIGURA 3 mostram os efeitos dos anta-  
gonistas acima citados sobre a implantação do ovo e gravidez  
em ratas

Dentre os grupos tratados apenas os que receberam o  
WEB 2086 e WEB 2170 foram capazes de inibir a gravidez num  
percentual de 33 e 66,6%, respectivamente. Dos animais que  
apresentaram implantes, não houve diferença estatística,  
quando comparados ao controle, no nº de sítios de implantação  
por rata grávida. O nº de filhotes nascidos por animal foi  
significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos trata-  
dos, quando comparados ao controle. As perdas fetais foram de  
35,0%, 47,8%, 43,5% e 47,6% para os grupos tratados com  
BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170, respectivamente, na-  
vendo diferença estatística nestes percentuais quando compa-  
rados ao controle ( $p < 0,05$ )

Apenas o grupo tratado com o WEB 2170 apresentou  
prolongamento do tempo de gestação ( $27,5 \pm 0,4$  dias) quando  
comparado ao controle ( $p < 0,05$ )

Os filhotes nascidos não apresentaram anormalidades

TABELA 1 Efeito de antagonistas seletivos do PAF, BN 52021, RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170 sobre a implantação do ovo e gravidez em ratas.

PARÂMETROS	CONTROLE (VEÍCULO)	BN 52021 10mg/Kg, i.p.	RP 48740 10mg/Kg, i.p.	WEB 2086 10mg/Kg, i.p.	WEB 2170 10mg/Kg, i.p.
Nº DE ANIMAIS TRATADOS	10	6	6	6	6
Nº DE IMPLANTES/ANIMAL	10,10,9,8,11 8,8,10,10,9	11,12,8,12,7,10	9,9,8,11,7,10	9,8,11,9,0,0	0,10,11,0,0,0
% DE INIBIÇÃO DA GRAVIDEZ	0	0	0	33*	66,6**
Nº DE IMPLANTES/RATA GRÁVIDA (MÉDIA ± E.P.)	9,3 ± 0,3	10,0 ± 0,8	9,0 ± 0,6	9,2 ± 0,6	10,5 ± 0,5
Nº DE FILHOTES NASCIDOS/ANIMAL	10,10,9,7,11 8,8,10,10,9	4,5,6,10,6,8	4,5,4,5,4,6	6,6,5,4,0,0	0,6,5,0,0,0
Nº DE FILHOTES NASCIDOS/ANIMAL (MÉDIA ± E.P.)	9,2 ± 0,4	6,5 ± 0,9*	4,7 ± 0,3*	5,2 ± 0,5*	5,5 ± 0,5*
% DE PERDAS FETAIS	2,2	35,0*	47,8*	43,5*	47,6*
TEMPO DE GESTAÇÃO (DIAS) (MÉDIA ± E.P.)	22,3 ± 0,2	22,5 ± 0,2	22,8 ± 0,2	23,9 ± 0,5	27,5 ± 0,4

- Todos os animais foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez

i p - intraperitoneal

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01



FIGURA 3 - Efeito dos antagonistas do PAF (WEB 2086 e WEB 2170) sobre a gravidez, em ratas tratadas do 4º ab 6º dia da gestação, mostrando inibição completa dos sítios de implantação uterina.

anatômicas visíveis

As estruturas destes antagonistas do PAF estudadas encontram-se demonstradas na FIGURA 1

#### 4 1 2 - Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo nos Sete Primeiros Dias da Gravidez, em Ratas

Os resultados deste experimento encontram-se demonstrados na TABELA 2

Os grupos tratados com o WEB 2086 (5mg/Kg, i.p.) e com o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) exibiram percentuais de inibição da gravidez de 33 e 50%, respectivamente. Dos animais que apresentaram implantes houve redução significativa no nº de implantes por rata grávida ( $p < 0,05$ ) e no nº de filhotes nascidos por animal ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao controle.

O grupo tratado com o WEB 2086 apresentou 22.6% de perdas fetais diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle e o grupo do WEB 2170 mostrou apenas 5% de perdas fetais.

#### 4 1 3 - Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 nos Dias 8 à 14 da Gravidez, em Ratas

Neste experimento, as ratas grávidas tratadas com o WEB 2086 e WEB 2170 não apresentaram aumento do volume abdominal e nem nascimento de filhotes. No 28º dia da gravidez os animais foram sacrificados e foi observado reabsorção



TABELA 2. Efeito do tratamento com o WEB 2086 e WEB 2170 sobre a implantação do ovo e gravidez em ratas

PARÂMETROS	CONTROLE (VEÍCULO)	WEB 2086 5mg/Kg, i.p.	WEB 2170 5mg/Kg, i.p.
Nº-DE ANIMAIS TRATADOS	6	6	6
Nº DE IMPLANTES/ANIMAL	11,9,9,10,10,8	0,2,9,8,0,12	7,0,9,0,4,0
% DE INIBIÇÃO DA GRAVIDEZ	0	33*	50**
Nº DE IMPLANTES/RATA GRÁVIDA (MÉDIA ± E.P.)	9,5 ± 0,4	7,7 ± 2,1*	6,6 ± 1,6**
Nº DE FILHOTES NASCIDOS/ANIMAL (MÉDIA ± E.P.)	8,6 ± 0,5	6,0 ± 1,7**	6,3 ± 1,4**
% DE PERDAS FETAIS	8,7	22,6*	5,0
TEMPO DE GESTAÇÃO (DIAS) (MÉDIA ± E.P.)	22,2 ± 0,16	22,5 ± 0,29	23,3 ± 0,66

- Os animais foram tratados do 1º ao 7º dia da gravidez

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

completa dos fetos, sem anormalidades anatômicas visíveis no útero e ovário. As completas reabsorções encontram-se demonstradas na FIGURA 4

O grupo controle, tratado com o veículo, apresentou tempo de gestação normal ( $22.2 \pm 16$  dias) e o nº de filhotes nascidos por animal foi de  $8,6 \pm 0,5$

#### 4.1.4 - Efeito do WEB 2170, em Doses Crescentes, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas

Os resultados deste experimento encontram-se demonstrados na TABELA 3

Nos grupos tratados com 1, 5 e 10mg/Kg, i.p., houve inibição percentual da gravidez de 33,3; 50 e 66%, respectivamente. O WEB 2170 nas doses de 5 e 10mg/Kg, i.p., aumentou significativamente o percentual de inibição de gravidez quando comparado com o WEB 2170 na dose de 1mg/Kg, i.p. ( $p < 0,01$ ).

Com doses crescentes do WEB 2170 (10 e 20mg/Kg) via oral não houve aumento da inibição da gravidez que atingiu um percentual de apenas 20%

O nº de implantes por rata grávida não diferiu estatisticamente entre os grupos tratados ( $p < 0,01$ ) exceto o grupo tratado com o WEB 2170, 20mg/Kg, i.p. que apresentou redução no nº de implantes quando comparado aos grupos tratados nas doses de 10mg/Kg, i.p. e p.o. e 20mg/Kg, p.o. ( $p < 0,05$ )

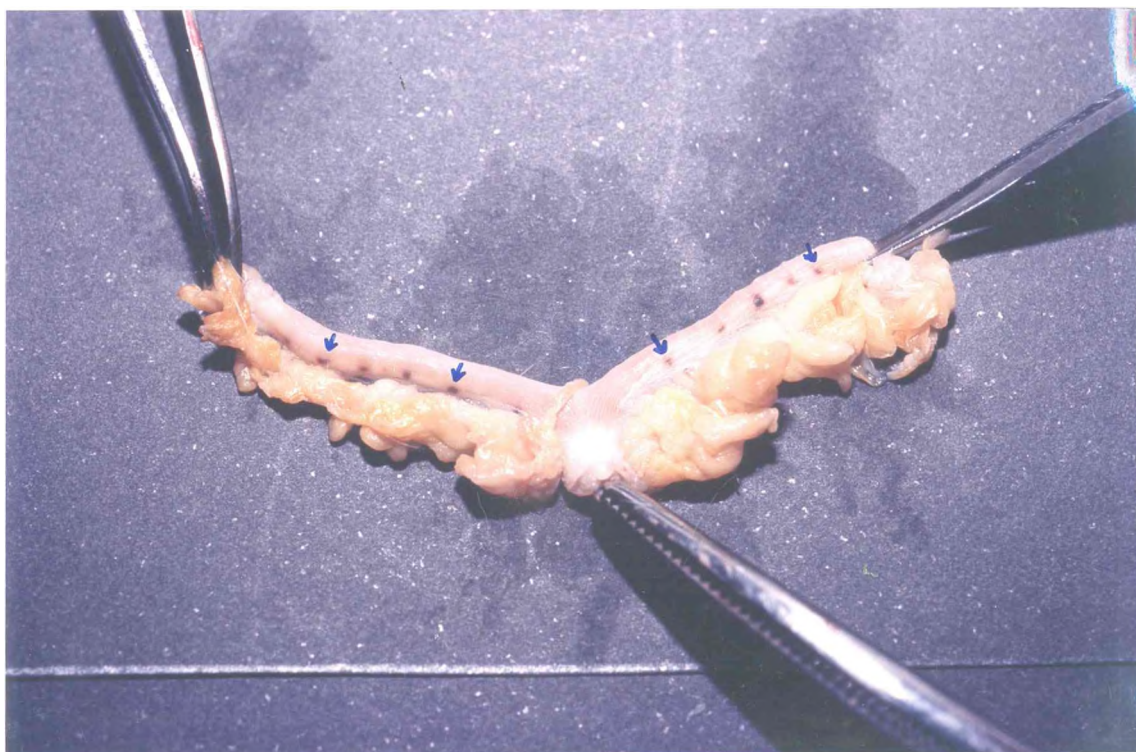


FIGURA 4 - Efeito do WEB 2170 sobre a gravidez, em ratas tratadas do 8º ao 14º dia da gravidez. As setas indicam as reabsorções fetais

TABELA 3 - Efeito do WEB 2170, em doses crescentes, sobre a implantação do ovo, em ratas

TRATAMENTO (WEB 2170)	DOSE	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	Nº DE IMPLANTES/ANIMAL	Nº DE IMPLANTES/ANIMAL (MÉDIA ± E.P.)	% DE INIBIÇÃO DA GRAVIDEZ
	1mg/Kg, i.p.	6	10,9,11,8,0,0	9,5 ± 0,5	33,3
	5mg/Kg, i.p.	6	8,9,0,0,0,10	9,0 ± 0,5	50**
	10mg/Kg, i.p.	6	0,10,11,0,0,0	10,5 ± 0,5	66,6**
	20mg/Kg, i.p.	6	0,0,8,11,0,6	8,3 ± 1,4*	50
	10mg/Kg, p.o.	5	8,0,10,11,11	10,0 ± 0,7	20
	20mg/Kg, p.o.	5	9,0,12,8,12	10,2 ± 1,0	20

- Todos os animais foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

#### 4.1.5 - Efeito de Inibidores da Fosfolipase A<sub>2</sub>, Cicloxigenase e Lipoxigenase sobre a Implantação do Ovo, em Ratas

A ação destes inibidores sobre a implantação do ovo encontram-se demonstradas na TABELA 4

Todas as drogas testadas (dexametasona, indometacina e EP 10161) exibiram uma inibição percentual da gravidez de 50%. A potência dessas drogas foi semelhante à do WEB 2170, no que concerne a inibição da gravidez, conforme dados apresentados na TABELA 5. Como mostra a TABELA 5 todas as drogas inibiram significativamente a gravidez quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,05$ )

O nº de implantes por rata grávida foi significativamente reduzido, nos grupos tratados com EP 10161 ( $p < 0,01$ ) e dexametasona ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao controle, o que não ocorreu nos grupos tratados com o WEB 2170 e indometacina.

#### 4.1.6 - Efeito da Associação de Inibidores da Cicloxigenase, Lipoxigenase e PAF, sobre a Implantação do Ovo, em Ratas

Os resultados deste experimento encontram-se registrados na TABELA 6

A associação do tratamento com indometacina (5mg/Kg, p.o.) + EP 10161 (10mg/Kg, i.p.) + WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) apresentou um percentual de inibição da gravidez de 66% sendo ligeiramente maior do que o tratamento com cada droga isoladamente.

TABELA 4 - Efeito do tratamento com inibidores da fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase e lipoxigenase sobre a implantação do ovo, em ratas

TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	Nº DE IMPLANTES/ANIMAL	Nº DE IMPLANTES/RATA GRÁVIDA (MÉDIA ± E.P.)	% DE INIBIÇÃO DA GRAVIDEZ
DEXAMETASONA (0,05mg/Kg, i.p.)	6	9,0,2,5,0,0	5,3 ± 2,0	50
INDOMETACINA (5mg/Kg, p.o.)	6	0,9,0,7,12,0	9,3 ± 1,4	50
EP 10161 (10mg/Kg, i.p.)	6	0,9,0,0,1,3	4,3 ± 3,0	50

- Todos os animais foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez.

TABELA 5 - Potência do WEB-2170 comparada à da indometacina, EP 10161 e dexametasona na implantação do ovo, em ratas.

TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	Nº DE IMPLANTES/ANIMAL	Nº DE IMPLANTES/RATA GRÁVIDA (MÉDIA ± E.P.)	% DE INIBIÇÃO DA GRAVIDEZ
CONTROLE (Veículo)	10	10,10,9,8,11 8,8,10,10,9	9,3 ± 0,3	0
WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.)	6	8,9,0,0,0,10	9,0 ± 0,6	50*
INDOMETACINA (5mg/Kg, p.o.)	6	0,9,0,7,12,0	9,3 ± 1,4	50*
EP 10161 (10mg/Kg, i.p.)	6	0,9,0,0,1,3	4,3 ± 3,0**	50*
DEXAMETASONA (0,05mg/Kg, i.p.)	6	9,0,2,5,0,0	5,3 ± 2,0*	50*

- Todos os animais foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez.

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

TABELA 6 - Efeito da associação de inibidores da ciclooxigenase, lipoxigenase e PAF sobre a implantação do ovo em ratas

TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	Nº DE IMPLANTES/ANIMAL	% DE INIBIÇÃO DA GRAVIDEZ
-----			
INDOMETACINA (5mg/Kg, p.o.)			
+			
EP 10161 (10mg/Kg, i.p.)	6	9,0,0,8,0,0	66 *
+			
WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.)			
-----			

- Todos os animais foram tratados do 4º ao 6º dia da gravidez

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01



#### 4.1.7 - Edema Inflamatório Agudo Induzido por PAF, Carragenina e Levedura de Cerveja, na Pata Direita de Ratos

##### 4.1.7.1 - Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por PAF

A ação das drogas acima citadas sobre a reação inflamatória aguda induzida por PAF encontra-se registrada na TABELA 7

O WEB 2170 na dose de 5mg/Kg, i.p. reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) o volume (ml) médio do edema de pata induzido por PAF ( $0,12 \pm 0,04$ ) quando comparado ao grupo controle tratado com o veículo ( $0,50 \pm 0,03$ ), mostrando uma inibição percentual do volume (ml) médio do edema de pata de 76%. No grupo tratado com indometacina o volume (ml) médio do edema de pata foi de  $0,34 \pm 0,04$  e a inibição do edema foi de 32%, inibição esta significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao controle

##### 4.1.7.2 - Efeito do WEB 2170 e Indometacina no Edema de Pata Induzido por Carragenina

O efeito dessas drogas sobre a reação inflamatória induzida por carragenina encontra-se registrado na TABELA 8

A indometacina (5mg/Kg, p.o.) reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) o volume (ml) médio do edema de pata induzido por carragenina ( $0,11 \pm 0,01$ ) quando comparado ao controle ( $0,84 \pm 0,05$ ) o que representou uma inibição do edema de

TABELA 7 - Efeito do WEB 2170 e indometacina no edema de pata induzido por PAF, em ratos.

TRATAMENTO	DOSE	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	VOLUME DA PATA (ml) (MÉDIA ± E.P.)	% DE INIBIÇÃO DO EDEMA
CONTROLE (Veículo)	-	6	0,50 ± 0,03	-
WEB 2170	5mg/Kg, i.p.	6	0,12 ± 0,04	76**
INDOMETACINA	5mg/Kg, p.o.	6	0,34 ± 0,04	32*

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

86,7%. O volume (ml) médio do edema de pata no grupo tratado com o WEB 2170 foi de  $0,56 \pm 0,12$  o que representou uma inibição do edema de 33,3% significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao controle.

#### 4 1 7 3 - Efeito do WEB 2170 e EP 10161 no Edema de Pata Induzido por Levedura de Cerveja

Os resultados deste experimento encontram-se demonstrados na TABELA 9.

O EP 10161 na dose de 10mg/Kg, i.p. reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) o volume (ml) médio do edema de pata ( $0,33 \pm 0,07$ ) quando comparado ao do controle ( $1,35 \pm 0,05$ ) o que representou em termos percentuais uma inibição de 75,6%.

No grupo tratado com o WEB 2170 o volume (ml) médio do edema de pata foi de  $0,99 \pm 0,07$  com uma inibição do edema de 26,7% significativa ( $p < 0,01$ ) quando comparada ao controle.

A TABELA 10 compara a potência do WEB 2170 no edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos (PAF, carragenina e levedura de cerveja).

#### 4 1 8 - Efeito do WEB 2170 sobre o Ciclo Estral, em Ratas

Os resultados do WEB 2170 sobre o ciclo estral encontram-se na TABELA 11.

Os animais tratados com o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.),

TABELA 8 - Efeito do WEB 2170 e indometacina no edema de pata induzido por carragenina, em ratos.

TRATAMENTO	DOSE	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	VOLUME DA PATA (ml) (MÉDIA ± E.P.)	% DE INIBIÇÃO DO EDEMA
CONTROLE (Veículo)	-	6	0,84 ± 0,05	-
WEB 2170	5mg/Kg, i.p.	6	0,56 ± 0,12	33,3*
INDOMETACINA	5mg/Kg, p.o.	6	0,11 ± 0,01	86,7*

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

TABELA 9 - Efeito do WEB 2170 e EP 10161 no edema de pata induzido por levedura de cerveja, em ratos.

TRATAMENTO	DOSE	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	VOLUME DA PATA (ml) (MÉDIA ± E.P.)	% DE INIBIÇÃO DO EDEMA
CONTROLE (Veículo)	-	6	1,35 ± 0,05	-
WEB 2170	5mg/Kg, i.p.	6	0,99 ± 0,07	26,7**
EP 10161	10mg/Kg, i.p.	6	0,33 ± 0,07	75,6**

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

TABELA 10 - Efeito do WEB 2170 no edema de pata induzido por PAF, carragenina e levedura de cerveja, em ratos.

TRATAMENTO	EDEMA DE PATA (ml) (MÉDIA ± E.P.)		
	GRUPOS CONTROLES	GRUPOS TRATADOS COM WEB 2170	% DE INIBIÇÃO DO EDEMA
PAF (2µg/pata)	0,50 ± 0,03 (6)	0,12 ± 0,04 (6)	76**
CARRAGENINA (1mg/pata)	0,84 ± 0,05 (6)	0,56 ± 0,12 (6)	33,3*
LEVEDURA DE CERVEJA (2,5mg/pata)	1,35 ± 0,05 (6)	0,99 ± 0,07 (6)	26,7**

- Parênteses indica o nº de animais no grupo

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

Reação 1/97

quando então verificava-se o tempo de gestação, número de filhotes nascidos por animal e as perdas fetais em cada grupo

### 3.1.2 - Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 sobre a Implantação do Ovo, nos Sete Primeiros Dias da Gravidez, em Ratas

Com a finalidade de avaliar a potência destes antagonistas do PAF no período mais precoce da gestação foram escolhidos, ao acaso, 3 grupos de 6 animais cada

O 1º grupo (controle) recebeu o veículo D.M.S.O. a 5% (2ml/Kg, i.p.) em 154mM de NaCl. o 2º, o WEB 2086 (5mg/Kg, i.p.) e o 3º, o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.).

Todos os grupos foram tratados do 1º ao 7º dia da gravidez, com as drogas acima citadas, em uma única injeção diária. No 10º dia da gravidez, as ratas foram laparotomizadas, sob ligeira anestesia com éter etílico, e o nº de sítios de implantação nos cornos uterinos foi verificado e anotado para cada animal. O abdome era fechado e esperava-se o término da gravidez, quando então, verificava-se o percentual de inibição da gravidez, tempo de gestação, nº de filhotes nascidos por animal e as perdas fetais em cada grupo

### 3.1.3 - Efeito do WEB 2086 e WEB 2170 nos Dias 8 à 14 da Gravidez, em Ratas

Com o intuito de averiguar possíveis efeitos sobre a organogênese fetal, o WEB 2086 e WEB 2170 foram administrados do 8º ao 14º dia da gravidez.

apresentaram-se em estro  $2,0 \pm 0,0$ ,  $1,2 \pm 0,2$  e  $1,0 \pm 0,3$  vezes no período de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, respectivamente, enquanto que, os animais do grupo controle, tratados com o veículo, apresentaram a fase estro  $2,0 \pm 0,0$ ,  $2,0 \pm 0,0$  e  $2,0 \pm 0,0$  vezes no período de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, respectivamente. O grupo tratado com o WEB 2170, apresentou um nº significativamente ( $p < 0,05$ ) menor de ocorrência da fase estro, por animal observado durante o período de tratamento e pós-tratamento. Após 10 dias do término do tratamento com o WEB 2170 os animais voltaram a apresentar a "fase estro" semelhante ao período pré-tratamento.

#### 4.1.9 - Efeito do WEB 2170 sobre a Atividade Uterotrópica Induzida pelo Estrógeno e nos Níveis de Fosfatase Alcalina, em útero de Ratas Imaturas

Os efeitos do WEB 2170 na resposta uterotrópica e nos níveis de fosfatase alcalina no útero estão representados na TABELA 12 e na FIGURAS 5 e 6

O peso médio dos úteros (mg) dos animais que receberam o WEB 2170 (5mg/Kg, i.p.) + Benzoato de estradiol (0,1ml, s.c.) foi de  $228,8 \pm 22,2$ mg que, quando comparado ao peso médio dos animais que receberam apenas o benzoato de estradiol ( $222,5 \pm 13,8$ mg) não diferiu estatisticamente. Da mesma forma, o peso médio dos úteros dos animais tratados com o WEB 2170 ( $31,0 \pm 3,0$ mg) não foi significativamente diferente, quando comparado ao peso médio dos úteros dos animais do grupo controle ( $34,5 \pm 3,02$ mg).



TABELA 11 - Efeito do WEB 2170 sobre o ciclo estral. em ratas

TRATAMENTO	DOSE	Nº DE OCORRÊNCIA DA FASE ESTRO/ANIMAL (MÉDIA ± E.P.)			
		PRÉ-TRATAMENTO (10 dias)	TRATAMENTO (10 dias)	PÓS-TRATAMENTO (10 dias)	PÓS-TRATAMENTO (10 dias)
CONTROLE (5)	-	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
WEB 2170 (5)	5mg/Kg, i.p.	2,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2*	1,0 ± 0,3*	2,0 ± 0,2

( ) - Parênteses indica nº de animais

\* p < 0,05

TABELA 12 - Efeito do WEB 2170 sobre a atividade uterotrópica induzida pelo estrógeno e nos níveis de fosfatase alcalina, em útero de ratas imaturas.

TRATAMENTO	DOSE E VIA DE ADMINISTRAÇÃO	Nº DE ANIMAIS/GRUPO	PESO DO ÚTERO (mg) (MÉDIA ± E.P.)	FOSFATASE ALCALINA (U/ml) (MÉDIA ± E.P.)
I - Controle				
óleo de milho	0,1ml, s.c.			
+	+	5	34,5 ± 3,02	0,40 ± 0,01
D.H.S.O. a 5%	0,16ml, i.p.			
II - Estrógeno				
Benzoato de Estradiol (0,1 g)	0,1ml, s.c.	5	222,5 ± 13,8*	0,57 ± 0,02*
III - WEB 2170				
	5mg/Kg, i.p.	5	31,0 ± 3,0	0,43 ± 0,02
IV - WEB 2170				
+	+	5	228,8 ± 22,2*	2,48 ± 0,01**
Estrógeno	0,1ml, s.c.			

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

Os níveis de fosfatase alcalina nos grupos tratados com benzoato de estradiol isoladamente ( $0,57 \pm 0,02$ ) e benzoato de estradiol + WEB 2170 ( $2,48 \pm 0,01$ ) foram significativamente maiores ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) quando comparados aos níveis da enzima do grupo controle ( $0,40 \pm 0,01$ ). O grupo tratado com WEB 2170 isoladamente não alterou os níveis da enzima significativamente quando comparado aos níveis da fosfatase alcalina do controle.

#### 4.2 - Experimentos "in vitro"

##### 4.2.1 - Útero isolado de rata não grávida

##### 4.2.1.1 - Efeito do WEB 2170 sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina, Ocitocina, Serotonina, Cloreto de Bário e Cloreto de Potássio

O resultado deste experimento encontra-se demonstrado na TABELA 13

As respostas contráteis induzidas por acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}M$ ) - FIGURA 7, serotonina ( $0,28 \times 10^{-7}M$ ), ocitocina ( $2,98 \times 10^{-7}M$ ), cloreto de bário ( $4 \times 10^{-4}M$ ) e cloreto de potássio ( $5,3 \times 10^{-2}M$ ) foram inibidas de maneira concentração dependente quando o WEB 2170 foi incubado em concentrações crescentes (5 a 20 $\mu$ g/ml) no banho. Essa inibição foi reversível após lavagem do tecido em cerca de 30 minutos. O

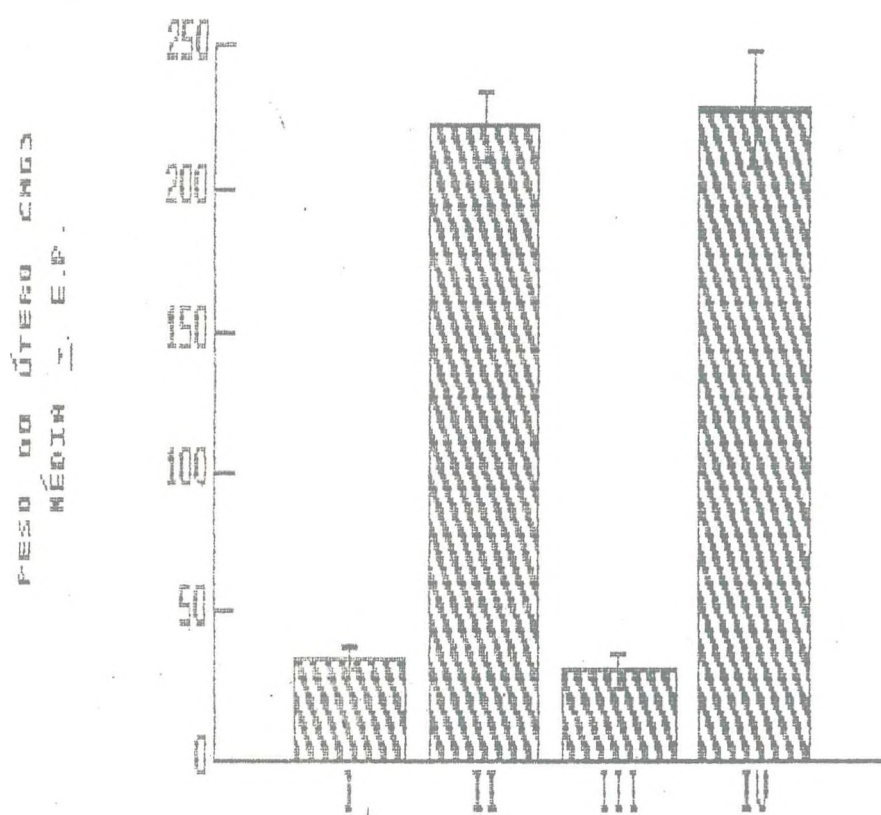


FIGURA 5 - Efeito do WEB 2170 sobre a atividade uterotrópica induzida pelo estrógeno em útero de ratas imaturas

- I - Controle - Grupo tratado com óleo de milho + D.M.S.O. 5%
- II - Grupo tratado com Benzoato de estradiol
- III - Grupo tratado com o WEB 2170
- IV - Grupo tratado com WEB 2170 + Benzoato de estradiol

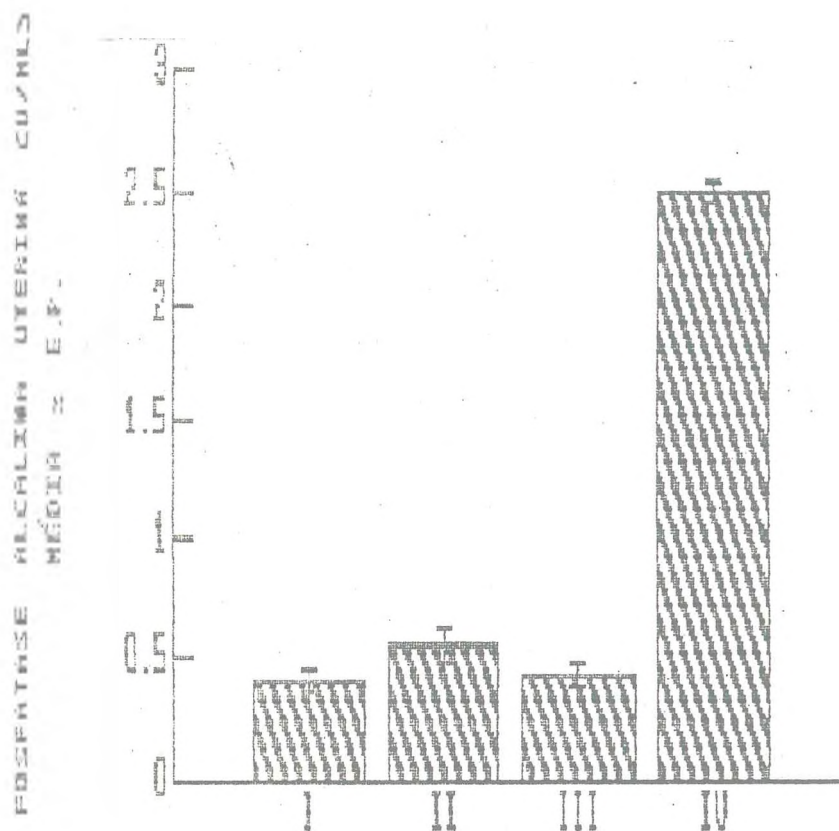


FIGURA 6 - Efeito do WEB 2170 nos níveis de fosfatase alcalina em útero de ratas imaturas.

- I - Controle - Grupo tratado com óleo de milho + D.M.S.O. 5%
- II - Grupo tratado com Benzoato de estradiol
- III - Grupo tratado com o WEB 2170
- IV - Grupo tratado com WEB 2170 + Benzoato de estradiol

veículo (D.M.S.O. a 5%) não apresentou efeito "per si" sobre este tecido não influenciando as respostas contráteis aos antagonistas estudados. Observou-se também ação relaxante da droga sobre a musculatura lisa uterina quando adicionada ao banho, evidenciada através da queda da linha de base (FIGURA 7)

As  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) do WEB 2170 para os agonistas utilizados foram  $0,17 \pm 0,02$ ,  $0,53 \pm 0,04$ ;  $0,29 \pm 0,03$ ,  $0,28 \pm 0,03$ ,  $0,28 \pm 0,02$ , respectivamente (TABELA 13 e FIGURA 8).

#### 4.2.1.2 - Efeito do WEB 2170 na Presença de Doses Crescentes de Cálcio, sobre as Contrações Induzidas por Acetilcolina

Como mostra a FIGURA 9, o WEB 2170 ( $20\mu\text{g/ml}$ ) inibiu marcadamente a contração induzida por acetilcolina. Quando o WEB 2170 ( $20\mu\text{g/ml}$ ) foi incubado na presença de concentrações crescentes de cálcio (1,2 a 4,8mM) a resposta contrátil à acetilcolina foi gradativamente e totalmente restaurada. Observou-se também efeito relaxante da droga sobre a musculatura uterina quando adicionada ao banho, evidenciado através da queda da linha de base (FIGURA 9)

#### 4.2.2 - Útero isolado de rata grávida

A FIGURA 10 mostra o efeito do WEB 2170 sobre a atividade espontânea de útero grávidico. O WEB 2170 nas doses de

TABELA 13 - Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por agonistas, em útero isolado de rata não grávida.

AGONISTAS	DOSE (M)	MÉDIA ± E.P. DA PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DA RESPOSTA			VALOR DA IC <sub>50</sub> (µg/ml DO WEB) (MÉDIA ± E.P.)
		CONTRATIL EM PRESENÇA DO WEB 2170 NAS DOSES DE (µg/ml)			
		5	10	20	
Acetilcolina	$1,10 \times 10^{-6}$	34,7 ± 4,4*	55,2 ± 7,03*	66,6 ± 7,03**	0,17 ± 0,02
5 - Hidroxitriptamina	$0,28 \times 10^{-7}$	13,6 ± 8,22	24,7 ± 9,64	44,7 ± 13,01*	0,53 ± 0,04
Ocitocina	$2,98 \times 10^{-12}$	27,0 ± 7,34	45,0 ± 7,08*	55,7 ± 10,8*	0,29 ± 0,03
Cloreto de Bário	$4,00 \times 10^{-4}$	34,5 ± 6,9*	46,3 ± 6,5*	57,4 ± 8,7*	0,28 ± 0,03
Cloreto de Potássio	$5,3 \times 10^{-2}$	26,4 ± 8,9	40,9 ± 13,6*	60,4 ± 19,3*	0,28 ± 0,02

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

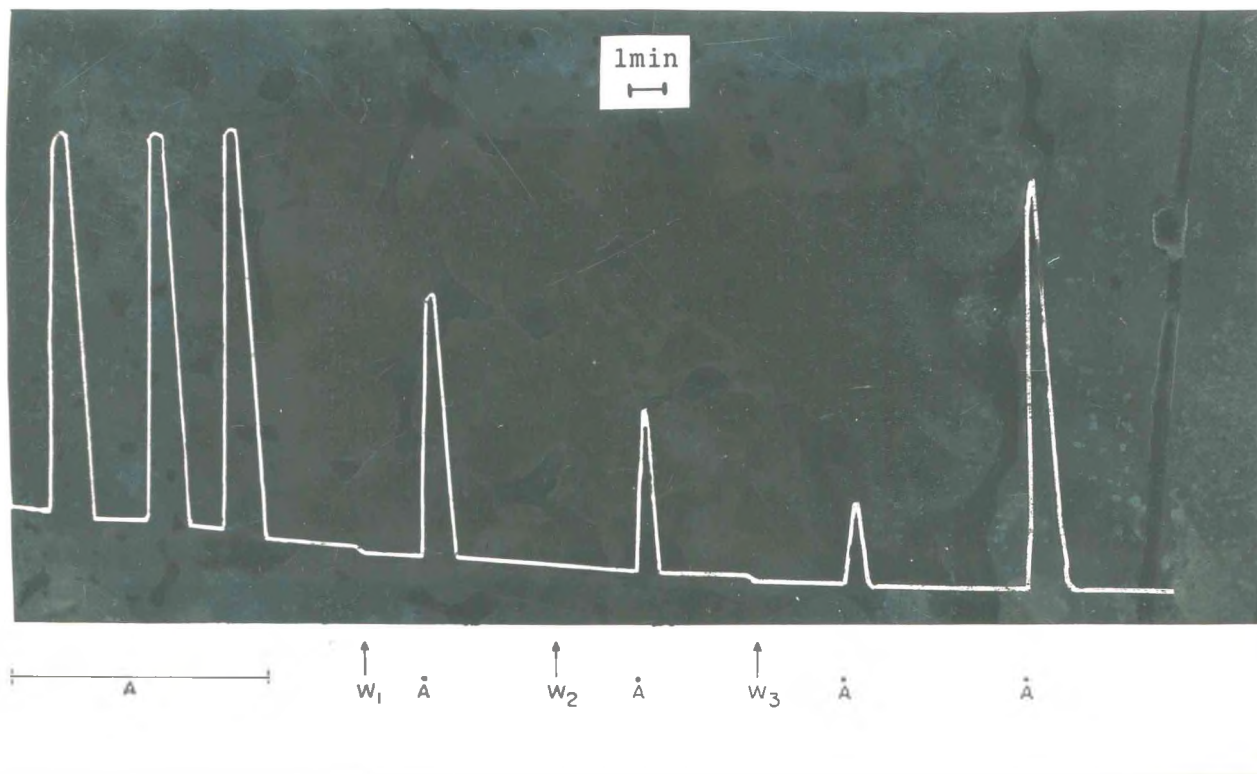


FIGURA 7 - Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}M$ ) em útero isolado de rata não grávida.

A - Acetilcolina

$W_1$  - WEB 2170 ( $5\mu g/ml$ )

$W_2$  - WEB 2170 ( $10\mu g/ml$ )

$W_3$  - WEB 2170 ( $20\mu g/ml$ )



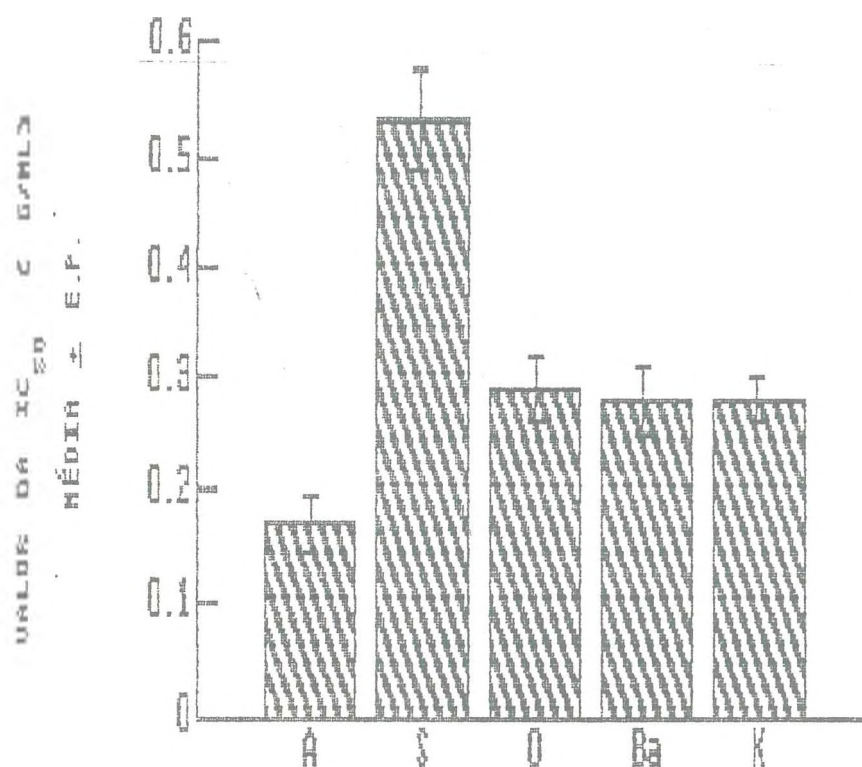


FIGURA 8 - Concentração do WEB 2170 ( $\mu\text{g/ml}$ ) necessária para inibir 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) das respostas contráteis à acetilcolina, serotonina, ocitocina, cloreto de bário e cloreto de potássio, em útero isolado de rata não grávida.

A - Acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}\text{M}$ )

S - Serotonina ( $0,28 \times 10^{-7}\text{M}$ )

O - Ocitocina ( $2,98 \times 10^{-12}\text{M}$ )

Ba - Cloreto de Bário ( $4 \times 10^{-4}\text{M}$ )

K - Cloreto de Potássio ( $5,3 \times 10^{-2}\text{M}$ )

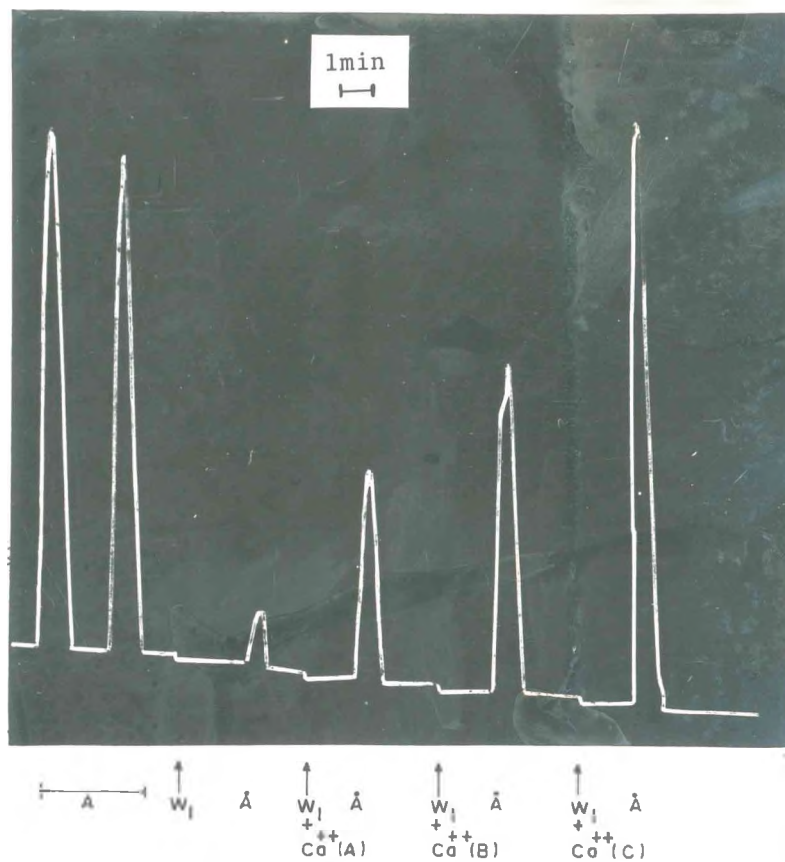


FIGURA 9 - Efeito do WEB 2170 na presença de doses crescentes de cálcio sobre as contrações induzidas por acetilcolina ( $0,57 \times 10^{-6}M$ ) em útero isolado de rata não grávida.

A - Acetilcolina

$W_1$  - WEB 2170 ( $20\mu g/ml$ )

$Ca^{++}$  (A) - 1,2mM

$Ca^{++}$  (B) - 2,4mM

$Ca^{++}$  (C) - 4,8mM

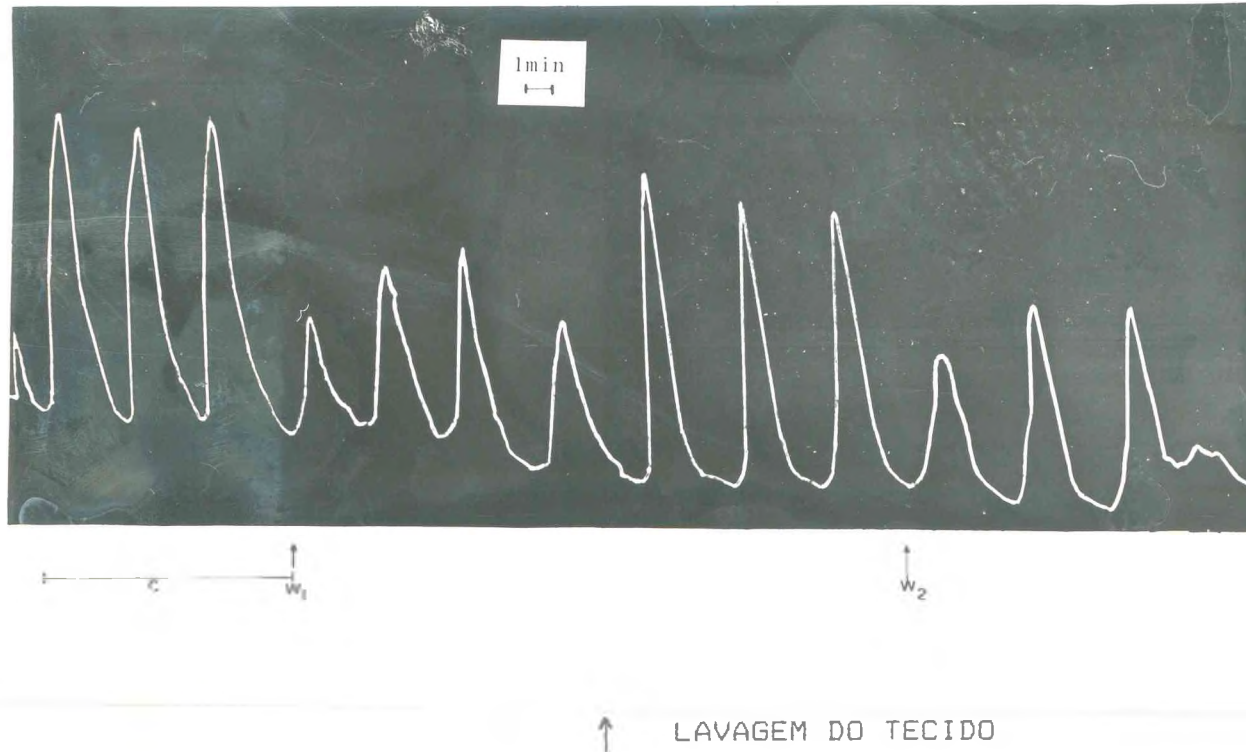


FIGURA 10 - Efeito do WEB 2170 sobre as contrações espontâneas de rata grávida.

C - CONTROLE

$w_1$  - WEB 2170 ( $5\mu\text{g/ml}$ )

$w_2$  - WEB 2170 ( $10\mu\text{g/ml}$ )

5 e 10 $\mu$ g/ml inibiu marcadamente as contrações espontâneas, sendo reversível este efeito, em cerca de 20 minutos após lavagem do tecido.

#### 4.2.3 - Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por acetilcolina, em jejuno isolado de rata

O WEB 2170 quando adicionado ao banho nas doses de 5, 10 e 20 $\mu$ g/ml não inibiu significativamente as contrações induzidas por acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}$ M) em jejuno isolado de rata quando comparado ao útero isolado de rata não grávida ( $p < 0,05$ ), porém apresentou também ação relaxante sobre a musculatura lisa intestinal, evidenciada através da queda da linha de base (TABELA 14 e FIGURA 11).

TABELA 14 - Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}M$ ) em jejuno e útero isolados de rata.

MÉDIA $\pm$ E.P. DA PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL EM PRESENÇA DO WEB 2170 NAS DOSES DE ( $\mu g/ml$ )			
	5	10	20
Jejuno	10,5 $\pm$ 3,17	16,1 $\pm$ 3,35	18,1 $\pm$ 3,23
útero	34,7 $\pm$ 4,4*	55,2 $\pm$ 7,03*	66,6 $\pm$ 7,03*

\*  $p < 0,05$

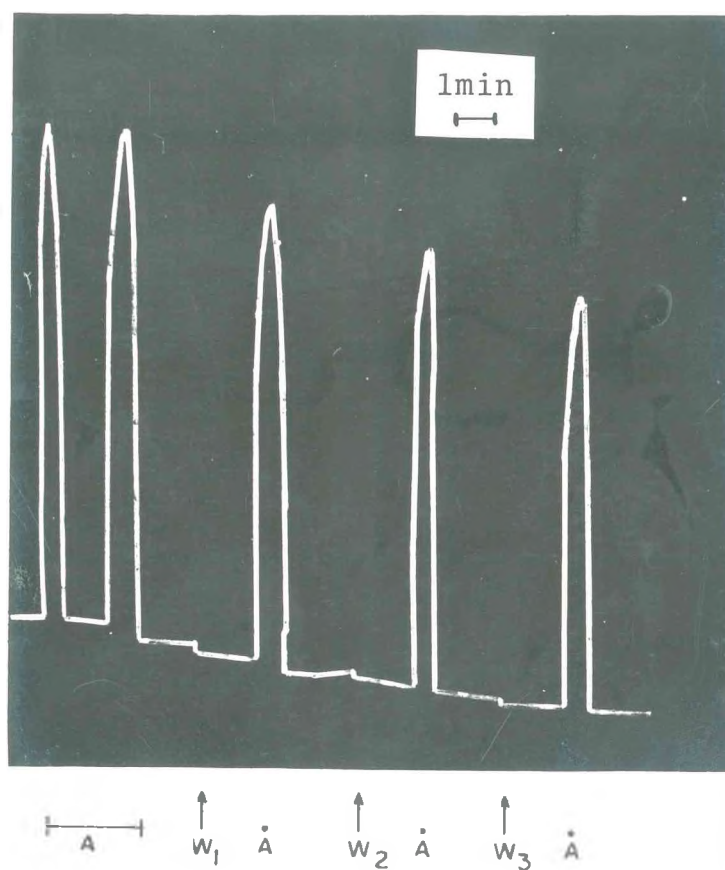


FIGURA 11 - Efeito do WEB 2170 sobre as contrações induzidas por acetilcolina ( $1,1 \times 10^{-6}M$ ) em jejuno isolado de rata.

A - Acetilcolina

W<sub>1</sub> - WEB 2170 ( $5\mu g/ml$ )

W<sub>2</sub> - WEB 2170 ( $10\mu g/ml$ )

W<sub>3</sub> - WEB 2170 ( $20\mu g/ml$ )

## 5 - DISCUSSÃO

O fator ativador de plaquetas (PAF-aceter) está envolvido na ovulação (DAPHNA-IKEN et al, 1989), nidacão (ACKER et al, 1988) e contratilidade uterina (MEDEIROS & CALIXTO, 1989), sendo essencial para o estabelecimento da gravidez (SPINKS & O'NEILL, 1987, 1988; SPINKS et al, 1989). SPINKS & O'NEILL (1987) e O'NEILL et al (1989) trabalhando com roedores e humanos, respectivamente, observaram que a suplementação do meio de cultura com PAF-aceter aumentava o potencial de gravidez nas transferências de pré-embriões produzidos nas fertilizações "in vitro", reforçando sua influência no processo reprodutivo. Conseqüentemente, o presente estudo foi realizado para verificar os efeitos do WEB 2170, um antagonista seletivo do receptor PAF pertencente ao grupo dos heptazepínicos (WEBER & HEVER, 1989), na ovulação, implantação do ovo e contratilidade uterina e para confirmar o papel do PAF na reprodução.

Em experimento preliminar foram estudados quatro antagonistas do PAF, o BN 52021 (Ginkogolide B), RP 48740, WEB 2086 e WEB 2170 na implantação do ovo, em ratas. As drogas foram administradas intraperitonealmente do 4º ao 6º dia da gravidez, na dose de 10 mg/Kg, considerada exercer ação antiinflamatória em modelo experimental de inflamação aguda. Dentre os antagonistas testados apenas os compostos heptazepínicos WEB 2086 e WEB 2170 inibiram a gravidez num percentual de 33.3 e 66.6% respectivamente. O composto sintético RP 48740 e o BN 52021 não afetaram a nidacão. Entretanto

todos os antagonistas reduziram o número de filhotes nascidos e promoveram perdas fetais (35 a 48%).

A inibição da nidadação foi também evidenciada em estudos anteriores utilizando o BN 52021 (ACKER et al, 1988; SPINKS & O'NEILL, 1989), WEB 2086, SRI 63441 e SRI 64112 (SPINKS & O'NEILL, 1989).

Os efeitos observados anteriormente com o uso do BN 52021 não estão de acordo com as nossas observações nas quais essa droga não inibiu a gravidez. Tal discrepância pode ser atribuída a via de administração da droga. Os autores acima citados administraram-na diretamente no lúmen uterino enquanto no presente estudo foi utilizada a via intraperitoneal.

Além da via de administração, fatores tais como, dose empregada, dias de tratamento e espécies animais diferentes poderiam contribuir para variações na farmacocinética destes antagonistas do receptor PAF, resultando em diferentes concentrações efetivas no seu sítio de ação dentro do trato reprodutivo e isto poderia explicar a incapacidade do BN 52021 e RP 48740 em inibir a implantação do ovo.

Outra possibilidade seria a existência na mesma espécie animal ou em espécies diferentes de subtipos de receptores do PAF (LAMBRECHT & PARNHAM, 1986) capazes de mediar respostas funcionais distintas no mesmo tipo celular.

Se os antagonistas do PAF, pertencentes a grupos diversos, atuam no mesmo receptor ou em diferentes subtipos de receptores permanece por ser esclarecido. Na tentativa de aumentar a potência dos compostos WEB 2186 e WEB 2170 em inibir a implantação do ovo e diminuir as perdas fetais, estas drogas foram administradas num período mais precoce da



gestação ( nos primeiros sete dias da gravidez) na dose de 5mg/Kg, i.p. Não se observou aumento no percentual de inibição da gravidez, mostrando talvez que o efeito dessas drogas se concentre mais no período peri-implantação (4<sup>o</sup> ao 6<sup>o</sup> dia da gravidez) e que o PAF é importante na preparação do útero para a nidacão.

Com o mesmo objetivo foi feito um estudo dose resposta com o WEB 2170, composto encontrado apresentar maior inibição da gravidez. Observou-se um bloqueio dose dependente, sobre a implantação do ovo, com o WEB 2170 nas doses de 1, 5 e 10mg/Kg, i.p., o que representou em termos percentuais uma inibição da gravidez de 33,3; 50 e 66,6%, respectivamente. Aumentando-se a dose para 20mg/Kg, i.p. apenas 50% de inibição foi observado, indicando potência máxima do WEB 2170 na dose de 10mg/Kg e **diminuição** da eficácia com doses maiores. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por SPINKS et al (1989), que verificaram que o bloqueio da implantação do ovo ocorria apenas com variações pequenas nas doses dos antagonistas do PAF empregados e que em doses maiores o efeito desaparecia.

O WEB 2170 nas doses de 10 e 20mg/Kg via oral foi menos efetivo em inibir a gravidez, quando comparado com a via intraperitoneal, apresentando apenas 20% de inibição da nidacão. ACKER et al (1988) também demonstraram que o BN 52021 administrado oralmente na dose de 4mg/Kg inibia a implantacãodo ovo em apenas 20% e com dose igual ou maior que 8mg/Kg nenhum efeito foi observado.

Um dos primeiros sinais de implantação do ovo fertilizado no útero é um aumento localizado da permeabilidade vascular, que é essencial para que ocorra a reação decidual

(PSYCHOYOS, 1960b). Esta resposta vascular foi comparada a uma reação inflamatória transitória local (MALATHY et al, 1986; TAWFIK et al, 1987). Vários mediadores químicos têm sido propostos como iniciadores desse processo inflamatório incluindo histamina (KRAICER & SHELESNYAK, 1958), serotonina (PSYCHOYOS, 1960), prostaglandinas (PHILLIPS & POYSER, 1981), leucotrienos (MALATHY et al, 1986) e PAF-aceter (ACKER et al, 1989).

Partindo-se da possibilidade do envolvimento de vários mediadores químicos no processo reprodutivo foi analisado um inibidor da ciclooxigenase (Indometacina), um da lipoxigenase (EP 10161) e um inibidor da fosfolipase A<sub>2</sub> (dexametasona). As drogas foram administradas do 4º ao 6º dia da gravidez nas doses capazes de exercer ação antiinflamatória em modelo experimental de inflamação aguda. Observou-se um bloqueio significativo da implantação do ovo (50%) com cada droga estudada.

O efeito bloqueador da indometacina sobre a implantação do ovo está de acordo com os achados de KENNEDY et al (1986) e PHILLIPS & POYSER (1981). ACKER et al (1988) também observou que o EP 10045, um inibidor da lipoxigenase, inibia a implantação do ovo quando injetado no lúmen uterino no 5º dia da gravidez.

Os corticosteróides da adrenal e a adrenocorticotrofina têm sido mostrados afetar ratas grávidas (VELARDO, 1957). Uma diminuição na média do número de filhotes foi observada quando ratas grávidas foram submetidas a situações de stress (EUKER & RIEGLE, 1973). Os resultados obtidos com o uso exógeno de dexametasona na gravidez, em ratas, não foi surpresa.

A dexametasona induz a síntese e/ou liberação de uma proteína chamada lipocortina (BLACKWELL et al, 1982), inibidora da fosfolipase  $A_2$ , que quando ativada libera ácido aracdônico e liso-PAF de fosfolipídeos de membrana geradores de mediadores inflamatórios eicosanóides e PAF (ALBERT & SYNDER, 1983). Provavelmente, o mecanismo envolvido no efeito bloqueador da dexametasona, indometacina e EP 10161 na implantação do ovo seja a não produção desses mediadores vaso-ativos essenciais para que ocorra a decidualização.

O presente estudo permite atribuir a todos esses mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos e PAF) um papel importante no processo de implantação do ovo. Entretanto o uso de antagonistas desses mediadores químicos testados individualmente foram capazes de produzir somente um bloqueio parcial da nidação. Esforços foram feitos para aumentar a potência destas drogas, usando a associação do WEB 2170 com um inibidor da cicloxigenase (indometacina) e com um da lipoxigenase (EP 10161). Entretanto, nenhum aumento significativo no bloqueio da gravidez pode ser observado com esta associação. Estas observações levantaram a possibilidade do PAF mediar seus efeitos na implantação do ovo através da liberação de prostaglandinas e leucotrienos.

Não está claro se o bloqueio da implantação do ovo observado com o WEB 2170 foi resultado do antagonismo específico do receptor PAF ou devido a um efeito supressivo inespecífico da reação inflamatória local que precede à nidação envolvendo outros mediadores inflamatórios. Portanto, experimentos foram realizados para analisar a especificidade do WEB 2170 em antagonizar o receptor-PAF no modelo animal de inflamação aguda induzida por PAF-aceter, carragenina e

levedura de cerveja na pata direita de ratos

O edema inflamatório induzido por carragenina envolve predominantemente produtos do ácido aracdônico, derivados da via da cicloxigenase (VINEGAR et al, 1987) e pode ser inibido por drogas antiinflamatórias não esteroidais (LOMBARDINO, 1985) enquanto que o edema induzido por levedura de cerveja, envolve acentuadamente produtos do ácido aracdônico derivados da via da lipoxigenase e pode ser antagonizado mais efetivamente por inibidores específicos da lipoxigenase.

Nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina e levedura de cerveja, inibidores respectivos da cicloxigenase e lipoxigenase, indometacina e EP 10161, exerceram inibição mais potente do que o WEB 2170, antagonista do receptor-PAF

O edema de pata induzido por PAF, em ratos, foi marcadamente inibido pelo WEB 2170 e em menor extensão pelo inibidor da cicloxigenase (indometacina).

Estes resultados estão de acordo com observações anteriores utilizando outros antagonistas do PAF, como o BN 52021. A inibição realizada pela indometacina neste modelo não está de acordo com os achados de SILVA et al (1986) que não atribuiu papel aos metabólitos da cicloxigenase na ação endematogênica exercida pelo PAF na pata de ratos.

Baseado nestes resultados pode-se concluir que o WEB 2170 é um potente e específico antagonista do receptor PAF e seu efeito bloqueador na implantação do ovo e gravidez deve-se ao antagonismo do receptor PAF. Entretanto a influência exercida, em menor extensão, por inibidores do metabolismo do ácido aracdônico não pode ser esquecida já que o PAF é capaz de induzir a liberação de prostaglandinas e leucotrie-

nos em vários tipos de células e tecidos (KENNEDY, 1977)

Vários trabalhos, em ratos, apontaram um aumento intra-útero da atividade da fosfolipase  $A_2$  durante o início da gravidez, principalmente durante o período pré-implantação (COX et al, 1982). O pico de atividade da fosfolipase  $A_2$  por volta do 4º dia da gravidez, com concomitante liberação de ácido aracdônico livre e liso-PAF, precursores de eicosanóides e PAF, compostos biologicamente ativos, reforçam a idéia de que estes metabólitos influenciam a reação inflamatória que prepara o endométrio para a nidacção (PAKRASI et al, 1985, MALATHY et al, 1986, TAWFIK et al, 1987)

Estudos prévios relataram que a atividade da fosfolipase  $A_2$  em ratas hipofisectomizadas está sob influência dos hormônios esteróides (DEY et al, 1982). Tem sido mostrado que o estrógeno estimula a produção de prostaglandinas (HAM et al, 1975; TAWFIK et al, 1987), leucotrienos (TAWFIK et al, 1987; GUPTA et al, 1989) e PAF no útero e isto poderia estar relacionado aos elevados níveis de atividade da fosfolipase  $A_2$  após estimulação estrogênica.

O pico de estradiol que ocorre na manhã do 4º dia da gravidez (SHAIKH, 1971) é um pré-requisito para o aumento na produção de prostaglandinas, leucotrienos e PAF no período pré-implantação do ovo fertilizado.

Os achados sugerem que o processo inflamatório que ocorre na época da nidacção é complexo e não é dependente de um único grupo de mediadores químicos. Não somente os mediadores lipídicos, mas talvez outros mediadores inflamatórios possam realizar um papel importante na reação inflamatória necessária para a efetiva nidacção. Esta reação inflamatória é de natureza transitória e autocontrolada provavelmente

envolvendo interleucina I (ROMERO et al, 1989) e proteínas inflamatórias macrofágicas 1 e 2 (WOLPE & CERAMI, 1989). Portanto, a descoberta de antagonistas específicos para mediadores químicos com amplo espectro de atividade possa talvez dirigir melhor o caminho na busca do controle terapêutico da fertilidade.

O pico de estradiol que ocorre no 4º dia da gravidez se faz necessário para que ocorra a nidadação em roedores (MAYER, 1959). O WEB 2170 poderia inibir a implantação do ovo por bloquear este pico hormonal ou sua ação no trato reprodutivo. Portanto, o presente estudo verificou a possibilidade de ação anti-estrogênica desse antagonista, em útero de ratas imaturas. Os resultados mostraram que o WEB 2170 não apresentou ação estrogênica ou anti-estrogênica. Entretanto, um aumento na atividade da fosfatase alcalina induzida pelo estrógeno, em útero de ratas imaturas, foi significativamente potencializado por este composto. Estes achados não foram esclarecidos e merecem posterior elucidação.

As ratas tratadas com o WEB 2170 e WEB 2086 nos dias 8 a 14 da gravidez, apresentaram reabsorções fetais completas, mostrando que os antagonistas do PAF podem alterar o desenvolvimento fetal nos embriões pós-implantados.

O desenvolvimento embrionário normal necessita de um adequado equilíbrio nos níveis séricos de estrógeno e progesterona (DEANSELY, 1966). Trabalhos realizados em roedores por SPINKS & O'NEILL (1988) utilizando um antagonista específico do PAF, o SRI 63-441, no período pré-implantação, mostraram que a concentração sérica de progesterona nos animais tratados, não diferia significativamente do controle, demonstrando adequada função lútea nestes animais.

No presente experimento, o WEB 2170 não alterou a atividade uterotrópica induzida pelo estrógeno. Os antagonistas do PAF não parecem portanto afetar o estado hormonal das ratas.

Desconhece-se o mecanismo imunológico pelo qual o feto sobrevive no meio materno. Estudos recentes têm indicado que o sucesso da gravidez necessita de uma resposta imune específica e protetora. Várias substâncias supressoras tais como hormônios e proteínas da gravidez mostraram atenuar a resposta imune local inespecificamente (LEWIS et al, 1986). Tem sido sugerido também imunossupressão induzida pelo PAF-aceter na gravidez.

O PAF-aceter poderia regular a função linfocitária agindo diretamente na célula T e macrófago (BRAQUET et al, 1987) ou indiretamente através da liberação de leucotrienos, resultando na estimulação do linfócito T-supressor e consequentemente proteção do feto. O WEB 2170 bloquearia este mecanismo protetor antagonizando as ações do PAF, afetando assim o desenvolvimento fetal.

O tecido embrionário é considerado uma fonte rica de fatores de crescimento (HEATH, 1989). Muitos receptores para tais fatores e para o PAF envolvem proteínas ligadas ao trifosfato de guanosina (WATERFIELD, 1989) cujos sinais de transdução modulam várias reações celulares incluindo ativação, diferenciação e crescimento celular.

O antagonismo do receptor PAF poderia interferir com o funcionamento destes fatores de crescimento e ser responsável pelo bloqueio da organogênese fetal, observado com os compostos hexazepínicos no presente trabalho.

A ovulação parece envolver uma sequencia ordenada de

eventos, lembrando a inflamação. Uma hiperemia folicular cíclica acompanhada de edema e quimiotaxia leucocitária no ovário (SEOW et al, 1988) levantou a possibilidade do envolvimento do PAF no ciclo estral em ratos.

No presente trabalho a ciclicidade ovariana foi significativamente afetada em ratas que receberam o WEB 2170 por 10 dias consecutivos. Um prolongamento da fase diestro do ciclo estral foi evidente nestes animais. Entretanto a ciclicidade ovariana foi restaurada após 10 dias do término do tratamento.

O tratamento com o WEB 2170 poderia ter influenciado a função ovariana em um ou mais dos seguintes níveis: 1) A nível do sistema nervoso central alterando o padrão normal de secreção dos hormônios gonadotróficos pela glândula pituitária; 2) A nível ovariano bloqueando a função endócrina diretamente; ou 3) A nível de outros órgãos, tais como o fígado que está envolvido no processamento metabólico dos hormônios sexuais.

Tendo em vista a forte similaridade entre ovulação e inflamação (ABISOGUN et al, 1988) juntamente com o papel do PAF no processo inflamatório local e a capacidade do BN 52021, um antagonista específico do receptor PAF, de bloquear a ovulação após estímulo gonadotrófico exógeno (ABISOGUN et al, 1989), uma ação direta a nível ovariano pode ser atribuída ao WEB 2170.

A contratilidade uterina pode regular o funcionamento uterino oferecendo condições ótimas para implantação do blastocisto, crescimento fetal e finalmente parturição.

Os hormônios esteróides e uma variedade de mediadores químicos exercem influência modulatória na contratilidade do



útero. Sabe-se que o estrógeno aumenta e a progesterona diminui o potencial de membrana das células do miométrio influenciando diretamente na contratilidade muscular (JHIERSCH et al, 1959).

Vários hormônios e substâncias autacóides interagem especificamente com receptores de membrana desencadeando uma resposta contrátil uterina tanto "in vitro" como "in vivo". Estes incluem: catecolaminas, ocitocina, prostaglandinas, angiotensina, acetilcolina e serotonina (MILLER, 1967; SOLOFF, 1975; SOLOFF et al, 1973; LIN & GOODFRIEND, 1970; CUATRECASSAS, 1974; ROTH & CHUANG, 1987).

A presença de PAF em útero gravídico e mais recentemente em útero normal tem sido descrita (YASUDA et al, 1986). Pouco se conhece da sua ação sobre a contratilidade uterina. Neste trabalho o WEB 2170 foi utilizado em útero isolado de rata para verificar possíveis efeitos sobre as respostas contráteis provocadas por acetilcolina, serotonina, ocitocina, cloreto de bário e cloreto de potássio e sobre a atividade rítmica espontânea de útero gravídico.

O WEB 2170 apresentou maior efeito inibitório nas contrações induzidas por acetilcolina, cloreto de potássio e cloreto de bário. A ordem decrescente de inibição da ação dos agonistas pelo WEB 2170 foi a seguinte: Ach < KCl = BaCl < ocitocina < serotonina. Foi observado também potente inibição da atividade rítmica espontânea de útero de rata grávida na presença do WEB 2170. Os achados recentes juntamente com os resultados anteriores apresentados por MEDEIROS & CALIXTO (1989) da ação do PAF em útero isolado de ratas grávidas e não grávidas apoiam a sua influência modulatória na regulação da contratilidade uterina.

O mecanismo de ação dos antagonistas seletivos do receptor-PAF reside na capacidade destes compostos de bloquearem a ligação do PAF ao receptor e portanto inibir a mobilização do cálcio induzida pelo PAF (SELAKE & SMITH, 1989) importante na atividade contrátil da musculatura lisa.

O acoplamento eletromecânico mediado por mudanças no potencial de membrana celular e o acoplamento farmacomecânico que pode operar independentemente do potencial de membrana da célula, ambos podem aumentar ou diminuir o cálcio citoplasmático (SOMLYO et al, 1988) e alterarem a resposta contrátil do músculo liso.

Existem pelo menos dois tipos diferentes de canais, por onde ocorre passagem de fluxo iônico: um dependente de voltagem e outro operado por receptor. A tensão desenvolvida pela musculatura uterina é predominantemente dependente do cálcio extra-celular, já que o miométrio é pobre em retículo sarcoplasmático, entrando o cálcio na célula via canais dependentes de voltagem (EDMAN & SCHILD, 1962; BOLTON, 1979)

O efeito inibitório do WEB 2170 sobre as contrações uterinas induzidas por diferentes agonistas pode ser resultado do antagonismo do receptor PAF alterando o fluxo de íons cálcio transmembrana. A ação do WEB 2170 não parece envolver o sistema de proteínas contráteis do músculo liso visto que o efeito deste composto foi reversível após lavagem do tecido.

Vários antagonistas lentos dos canais de cálcio semelhantes ao Verapamil, nifedipina e nicardipina têm mostrado inibir a tensão desenvolvida pela musculatura lisa uterina "in vitro" (GRANGER et al, 1985; MILOVANOVIC et al, 1988) e "in vivo" (CSAPO et al, 1982; ABEL & HOLLINGSWORTH, 1985) por bloquear o fluxo de íons cálcio do meio extra para

o intra-celular, inibição esta, que pôde ser abolida quando o cálcio era adicionado ao meio.

A inibição pelo WEB 2170 das respostas contráteis uterinas evocadas por acetilcolina, foi também revertida quando concentrações crescentes de cálcio (1,2 a 4,8mM) foi adicionada ao banho

Diferentemente, as contrações provocadas por acetilcolina em jejuno isolado de rata foi moderadamente inibida pelo WEB 2170, podendo-se levantar a possibilidade da existência de subtipos diferentes de receptores do PAF em útero e jejuno de ratas. A alta seletividade do WEB 2170 para a musculatura uterina poderá posteriormente ser investigada na terapêutica de partos prematuros, visto que as drogas correntemente usadas terapeuticamente, como os estimulantes  $\beta_2$  adrenérgicos, possuem sérias limitações, tais como tolerância (BERG et al, 1985)

Tendo em vista, pelo presente trabalho, que o PAF está envolvido no processo reprodutivo fisiológico normal de ratos, um melhor conhecimento desse processo seria essencial para o manuseio correto dos problemas de infertilidade, bem como no controle da fertilidade

A inibição das ações do PAF efetuadas pelo WEB 2170 na ovulação, nidadação e contratilidade uterina vieram confirmar o seu papel no trato reprodutivo, em ratos

Se o WEB 2170 inibiu a gravidez, em ratos, apenas por alterar a contratilidade uterina ou por afetar a receptividade uterina, sendo hostil a implantação do blastocisto, ou ainda por atuar diretamente no desenvolvimento embrionário permanece por ser esclarecido

## 6 - CONCLUSÕES

Os resultados experimentais deste estudo permitem retirar as seguintes conclusões:

1. A marcada inibição da implantação do ovo no endométrio, juntamente com uma diminuição da ciclicidade ovariana normal que ocorreu em ratas tratadas com o WEB 2170, antagonista específico do receptor-PAF, reforçou o papel do PAF no processo reprodutivo em roedores.

2. Um processo inflamatório transitório local é fundamental para o sucesso da implantação do ovo no útero. Os mediadores lipídicos provavelmente realizam o maior papel neste processo. A supressão desta reação inflamatória por drogas com atividade antiinflamatória poderia resultar em prejuízo da fertilidade.

3. O WEB 2170, EP.10161 e indometacina quando testados individualmente ou em associação, em ratos, foram capazes de inibir a nidacão em igual extensão. Tal fato levanta a possibilidade de que PAF e eicosanóides têm papéis sobrepostos nas manifestações da reação inflamatória local que precede a nidacão, podendo o PAF mediar seus efeitos através da liberação de eicosanóides.

4. As completas reabsorções fetais observadas nas ratas que receberam o WEB 2170 nos dias 8 a 14 da gravidez indicam provavelmente uma ação do PAF no processo de crescimento e diferenciação celular nos embriões pós-implantados.

5. O prolongamento do período diestro do ciclo reprodutivo mostrou um efeito supressivo do WEB 2170 na função ovariana,

em ratos. A reversibilidade da função ovariana após o término do tratamento juntamente com uma marcada influência inibitória sobre a nidação poderá mostrar que o composto sob investigação tem valor contraceptivo.

6. O WEB 2170 inibiu a contratilidade uterina "in vitro" exibindo uma seletividade maior para a musculatura lisa uterina. Estudos "in vivo" deverão ser feitos na tentativa de poder usá-lo como opção terapêutica no controle de partos prematuros.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, M.H. & HOLLINGSWORTH, M. The potencies and selectivities of four calcium antagonists as inhibitors of uterine contractions in the rat in vivo. Br. J. Pharmacol., **85**: 263-9, 1985.
- ABISOGUN, A.O.; DAPHNA-IKEN, D.; REICH, R.; KRANZFELDER, D. TSAFRIRI, A. Modulation role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. Biol. Reprod., **38**: 756-62, 1988.
- ABISOGUN, A.O.; BRAQUET, P.; TSAFRIRI, A. The involvement of platelet-activating factor in ovulation. Science, **243**: 381-3, 1989.
- ACKER, G.; BRAQUET, P.; MENCIA-HUERTA, J.M. Role of platelet-activating factor (PAF) in the initiation of the decidual reaction in the rat. J. Reprod. Fert., **85**: 623-9, 1989.
- ACKER, G. HECQUET, F.; ETIENNE, A.; BRAQUET, P.; MENCIA-HUERTA, J.M. Role of platelet-activating factor (PAF) in the ovoimplantation in the rat: Effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021. Prostaglandins, **35**(2): 233-41, 1988.
- ACKER, M.; TSAFRIRI, A.; MENCIA-HUERTA, J.M. Role of platelet-activating factor (PAF) in ovoimplantation and decidual reaction in the rat: effect of ginkgolide B (BN52021). In: BRAQUET, P. ed. Ginkgolides - Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives s.l., J.R. Prous Science, 1989, v.2, p. 821-34.
- ANGLE, M.J.; JONES, M.A.; PINCKARD, R.N.; McMANAUS, L.M.;

- HARPER, M.J.K. Platelet-activating factor (PAF) in the rabbit uterus during early pregnancy. Biol. Reprod., 32 (suppl): 143, 1986.
- ALBERT, D.H. & SNYDER Biosynthesis of 1-alkyl-2-aceryl-sn-glycero 3 phosphocholine (Platelet activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A<sub>2</sub> and aceryl transferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. Journal of Biological Chemistry, 258: 97-102, 1983.
- ARCHER, C.B.; PAGE, C.P.; PAUL, W.; MORLEY, J.; McDONALD, D.A. Inflammatory characteristics of platelet-activating factor (PAF-acether) in human skin. Br. J. Dermatol., 110: 45-50, 1987.
- BAN, C.; BILLAN, M.M.; TRUONG, C.T.; JOHNSTON, J.M. Metabolism of platelet activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero 3-phosphocholine) in human fetal membranes and decidua vera. Arch. Biochem. Biophys., 246: 9-18, 1986.
- BAN, C.; BILLAN, M.M.; TRUONG, C.T.; JOHNSTON, J.M. apud BRAQUET, P.; TOUQUI, L.; SHEN, T.Y.; VARGAFTIG, B.B. Perspectives in platelet activating factor research. Pharmacol. Rev., 39(2): 97-161, 1987.
- BENVENISTE, J.; HENSON, P.M.; COCHRANE, C.G. Leucocyte dependent histamine release from rabbit platelets. the role of IgE, basophils and a platelet activating factor. J. Exp. Med., 136: 1356, 1972.
- BENVENISTE, J.; MENCIA-HUERTA, J.M.; DUVAL, D. Antigenic release of platelet-activating factor (PAF) from rat peritoneal and alveolar macrophages. Fert. Proc., 38: 1168, 1979a.

- BENVENISTE, J ; TENCE, M., VARENNE, P ; BIDAULT, J. ; BOULLET, C. ; POLONSKY, J. Semi-synthesis and proposed structure of platelet activating factor (PAF): PAF-acether and alkyl ether analogue of lysophosphatidylcholine. C. R. Acad. Sci. (Paris) 289: 1037-40, 1979b
- BERG, G. ; ANDERSON, R G.G. ; RYDEN, G. B-adrenergic receptors in human myometrium during pregnancy: changes in the numbers of receptors after B-mimetic treatment Am J Obstet Gynecol. 151: 372-95, 1985.
- BILLAH, M M , DI RENZO, G.C. ; BAR, C. ; TRUONG, C.I. ; HOFFMAN, D.R. ; ANCESCHI, N.M. ; BLEASDALE, J.E. ; JOHNSTON, J.M. Platelet-activating factor metabolism in human amnion and the responses of this tissue to extracellular platelet-activating factor. Prostaglandins, 30: 841-50, 1985.
- BLACKWELL, G. ; ROSA ARNUCCIO DI ROSA, M. ; ROSA, A.D.M. ; FLOWER, R ; ANGHAM, C ; PARENTE, L. ; PERIBCO, P ; RUSSEL, N. ; SMITH, C. ; STONE, D. Glucocorticoids induce the formation and release of antiinflammatory and antiphospholipase proteins into the peritoneal cavity of the rat Brit J Pharmac. 76: 185-94, 1982
- BOLTON, T B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev. 59: 606-92, 1979
- BRANDON, J.M. & BIBBY, M.C. apud FINN, C.A. Implantation, menstruation and inflammation Biol Rev. 61: 313-28, 1986.
- BRAQUET, P. The Ginkgolides: potent platelet-activating factor antagonists isolated from GINKGO BILOBA L. chemistry, pharmacology and clinical applications. Drugs Fut. 12(7): 643-99, 1987



- BRAQUET, P ; ROLA-PLESZCZYNSKI, M Platelet-activating factor and cellular immune responses Immunol Today, 8: 345-52, 1987
- BRAQUET, P., TAUGUI, L.; SHEN, T.Y.; VARGAFTIG, B.B. Perspectives in platelet-activating factor research Pharmacol Rev, 39(2): 97-161, 1987
- CAMUSSI, G ; AGLIETTA, M.; CODA, R.; BUSSOLINO, F ; PIACIBELLO, W.; TETTA, C. Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin of human PAF-acether. monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils Immunology, 42: 191, 1981
- CAMUSSI, G.; AGLIETTA, M.; MALAVASI, F.; TETTA, C.; PIACIBELLO, F ; SANAVIO, F.; BUSSOLINO, F. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture J Immunol, 131: 2397-403, 1983
- CASTRACANE, V.D ; SAKSENA, S.K ; SHAIKH, A.A. Effect of IUDs prostaglandins and indomethacin on the decidual cell reaction in the rat. Prostaglandins, 6: 397-405, 1974
- CHIGNARD, M TENCE, M ; Le CAVEDIC, J.P.; VARGAFTIG, B B BENVENISTE. J Is platelet activating factor (PAF) the mediator for the third pathway of platelet aggregation? Fert Proc, 38: 1342, 1979
- CORDEIRO, R ; MARTIN, M A.; HENRIQUES, M G M.D.; VARGAFTIG, B.B. Desensitization of PAF-induced rat paw edema by repeated intraplantar injection Life Sci, 39: 1871-8, 1987
- COX, C.; CHENG, H.C ; DEY, S.K. Phospholipase A<sub>2</sub> activity in the rat uterus during early pregnancy. Prostaglandins Leucot Med, 8(4): 375-81, 1982
- CSAPO, A T.; PURI, C.P.; TARRO, S.; HENZL, M.R. Reactivation

- of the uterus during normal and premature labor by the calcium antagonist nicardipine. Am. J. Obstet. Gynecol., 142: 483-91, 1982.
- CUATRECASSAS, P. Membrane receptors. Ann. Rev. Biochem., 43: 169-214, 1974.
- DAPHNA-IKEN, D.; CHUN, S.Y.; ABISOGUN, A.O.; TSAFRIRI, A. Platelet-activating factor, Ginkgolides and follicle rupture during ovulation/ In: BRAQUET, P. ed. Ginkgolides Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives, J. R. Prous Science, 1989, v. 2, p. 835-44.
- DEANSELY, R. apud WIEBOLD, J.L.; STANFIELD, P.H.; BECKER, W.C.; HILLERS, J.K. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. J. Reprod. Fert., 78: 185-192, 1986.
- De FEO, V.I. Determination of the sensitive period for the induction of the deciduomata in the rat by different inducing procedures. Endocrinology, 73: 488-97, 1963.
- DEMONPOULOUS, C.A.; PINCKARD, R.N.; HANAHEN, O.J. Platelet-activating factor: Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component. J. Biol. Chem., 254: 9355-8, 1979.
- DEY, S.K. & JOHNSON, D.C. Embryo-uterine interaction in implantation. Life Sci. 27(24): 2381-4, 1980.
- DEY, S.K.; HOVERSLAND, R.C.; JOHNSON, D.C. apud COX, C.; CHENG, H.C.; DEY, S.K. Phospholipase A<sub>2</sub> activity in the rat uterus during early pregnancy. Prostaglandins Leukot. Med., 8(4): 375-81, 1982.
- DI ROSA, M.; FLOWER, R.J.; HIRATA, F.; PARENTE, L.; RUSSO-MARIE, F. Anti-phospholipase proteins. Prostaglandins, 28: 441-2, 1984.

- DOMENJÓZ, R. Sur la mecanisme d'action des substances antinflammatoires Actual. Tes Pharmacol., 7: 73, 1954
- EDMAN, K A P & SCHILD, H. The need for calcium in contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. J. Physiol., 161: 424-41, 1962.
- ENDERS, A.C. & SCHLAFKE, S. apud FINN, C.A. Implantation menstruation and inflammation Biol. Rev., 61: 313-28, 1986
- ENDERS, A.C.; WELSH, A.O.; SCHLAFKE, S. Implantation in the rhesus monkey: Endometrial responses Am. J. Anat., 173: 147-69, 1985.
- ESPEY, L.L. Ovulation as an inflammatory reaction - a hypothesis Biol. Reprod., 22: 73-106, 1980
- EUKER, J.S. & RIEGLE, G.D. Effects of stress on pregnancy in the rat. J. Reprod. Fert., 34: 343-46, 1973
- FINN, C.A. Implantation of ova- assesment of the value of laboratory animals for th study of implantation in women Oxf. Rev. Reprod. Biol., 5: 272-89, 1983
- FINN, C.A. Implantation menstruation and inflammation Biol. Rev., 61: 313-28. 1986.
- GRANGER, S.E.; HOLLINGS, M.; WESTON, A.H. A comparison of several calcium antagonists on uterine, vascular and cardiac muscles from the rat. Br. J. Pharmacol., 85: 255-62, 1985
- GUPTA, A.; HUET, V.M.; DEY, S.K. Evidence for prostaglandins and leukotrienes as mediators of phase I of estrogen action in implantation in the mouse. Endocrinology, 124(1): 546-8, 1989
- HAM, E.A.; CIRILLO, V.J.; JANETTI, M.E.; KUEHL, Jr, F.A. Estrogen-directed synthesis of specific prostaglandins in

- the uterus Proc Natl Acad Sci U.S.A., 12: 1420, 1975
- HANAHAN, O.J.; TSUJI, H.; OLSON, M.S. Biochemical studies on endogenous inhibitors of platelet-activating factor. In INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLATELET ACTIVATING FACTOR AND STRUCTURALLY RELATED ALKYL ETHER LYPIDS. 39, Tokyo, 1989. p. 2
- HEARN, J.P. The embryo-maternal dialogue during early pregnancy in primates J Reprod Fert., 76: 809-19, 1986
- HEATH, J.K. & SMITH, A.G. Growth factors in embryogenesis Br. Med. Bull., 45: 319-36, 1989
- HILLEBRECHT, J. The routine assay of anti-phogistic compounds in the rat foot test. Arzneimittelforschung, 4: 607-14, 1954
- HOLTON, P.W. A modification of the method of Dale and Laidlaw for standardization of posterior pituitary extract. Br. J. Pharmacol. Chemoter., 3: 328, 1948.
- JHIERSCH, J.B.; LANDA, J.# & WEST, T.C. Transmembrane potentials in the rat myometrium during prgnancy. Am. J. Physiol., 196: 901-4, 1959
- JOHNSON, D.C. & DEY, S.K. Role of histamine in implantation dexamethasone inhibits estradiol-induced implantation in the rat. Biol. Reprod., 22: 1136-41, 1980.
- KENNEDY, T.G. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. Biol. Reprod., 16: 286-91, 1977
- Intrauterine infusion of prostaglandins and decidua-  
lization in rats with uteri differentially sensitized for  
the decidual cell reaction Biol. Reprod., 34: 327-35,  
1986
- KRAICER, P.F. & SHELESNYAK, M.C. The induction of deciduo-

- mata in the pseudopregnant rat by systematic administration of histamine and histamine releases. J. Endocrinol., 17: 324-8, 1958
- LAMBRECHT, G & PARNHAM, M. Kdsurenone distinguishes between different platelet-activating factor receptor subtypes on macrophages and polymorphonuclear leukocytes. Br. J. Pharmacol., 87: 287-9, 1986
- LEME, J G Regulatory mechanisms in inflammation new aspects of autopharmacology Br. J. Pharmacology, 12: 15-24, 1981
- LEWIS, J E ; COULAM, C B., BREANNAN, M.S. Immunologic mechanisms in the maternal-fetal relationship Mayo Clin. Proc., 61: 655-65, 1986.
- LIN, S Y & GOODFRIEND, T.L. Antagonism receptors. J. Physiol, 218: 1319-28, 1970
- LOMBARDINO, J G In: Non steroidal antiinflammatory drugs; LOMBARDINO, J.G.; Ed John Wiley and Sons, New York, NY, p 253, 1985
- MALATHY, P.V., CHENG, H.C.; DEY, S.K. Production of leukotrienes and prostaglandins in the rat uterus during periimplantation period. Prostaglandins, 32(4): 605-14, 1986
- MEDEIROS, Y.S. & CALIXTO, J.B. Effect of PAF-acether on the reactivity of the isolated rat myometrium. Braz. J. Med. Biol. Res., 22(9): 1131-5, 1989.
- MILLER, J B Adrenergic receptors in myometrium Ann. NY Acad. Sci., 139: 788-98, 1967
- MILKS, L C ; CONYERS, G P.; CRAMER, E B The effect of neutrophil migration on epithelial permeability. J. Cell Biol., 103: 2729-38, 1986
- MILOVANOVIC, S R ; OGNJANOVIC, J ; VARAGIC, V.M.; BOSKOVIC,

- B Effect of nicardipine on the isolated uterus and other smooth muscles of the rat. Arch Int Pharmacodyn Ther, 295 291-304, 1988.
- MONTRUCHIO, G.; ALLDATTI, G.; TETTA, C.; ROFFINELLO, C.; EMANUELLI, G & CAMUSSI, G. Prostaglandins, 132 539-54
- MORALES, T.I.; WOESSNER, J.F.; MARSH, J.M.; Le MAIRE, W.J. Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation. Biochim Biophys Acta, 756 119-22, 1983
- ODOR, D.L. & BLANDAU, R.S. Observations on fertilization and the first segmentation division in the rat ova. Am J Anat, 89 29-48, 1951
- O'NEILL, C. Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization in the mouse J Reprod Fertil, 73 559-66, 1985
- O'NEILL, C. & SAUNDERS, D.M. Assessment of embryo quality. Lancet, 2 1035-6, 1984
- O'NEILL, C.; GIDLEY-BAIRO, A.A.; PIKE, I.I.; SAUNDERS, D.M. A bio-assay for embryo-derived platelet activating factor as a means of assessing quality and pregnancy potential of human embryos Fertil Steril, 47 969-75, 1987
- O'NEILL, C.; COLLIER, M.; AMMIT, A.J.; RYAN, J.P.; SAUNDERS, D.M.; PIKE, I.L. Supplementation of in-vitro fertilisation culture medium with platelet activating factor. Lancet, 30 769-72, 1989
- PAKRASI, P.L.; BECKA, R.; DEY, S.K. Cyclooxygenase and lipoxigenase pathways in the preimplantation rabbit uterus and blastocyst. Prostaglandins, 29 481-94, 1985
- PHILLIPS, C.A. & POYSER, N.L. Studies on the involvement of prostaglandins in implantation in the rat. J Reprod

Fertil., 62: 73-81, 1981

PIROTZKY, E & BRAQUET, P. PAF-acether and kidney pathology.

In BRAQUET, P.; MANGOLD, H.; VARGAFTIG, B.B. eds  
Biologically active lipids: progress in biochemistry and  
pharmacology, Switzeland, Karger, 1988, v. 22, p 168-80

PSYCHOYDOS, A étude des relations de l'oeuf et de l'endometre  
ou cours du retard de la nidation on des premieres phases  
du processus de nidation chez la ratte. C. R. Acad. Sci.,  
(Paris) 2630: 1755-8, 1966

----- Nouvelle contribution de l'étude de la nidation de  
l'oeuf chez la ratte. C. R. Acad. Sci., 251: 3073-5,  
1960a.

----- La reaction deciduale est precedée de modifica-  
tions precoces de la permeabilité capillaire de l'uterus  
C. R. Acad. Sci., 154: 1384-7, 1960b

ROBBINS, S.L. & COTRAN, R.S. Inflamação e reparo: inflamação.  
In: ----- Patologia estrutural e funcional. 2. ed. Rio de  
Janeiro. Interamericana, 1983, cap 3, p 47-89.

ROMERO, R.; WU, Y.K.; BRODY, D.T.; OYARZUN, E.; DUFF, G.W.;  
DURUN, S.K. Human decidua: a source of interleukin I.  
Obstet. Gynecol., 73: 31-4, 1989

ROTH, B.L. & CHUANG, D. Multiple mechanisms of serotonergic  
signal transduction. Life Sci., 41: 1051-64, 1987.

ROY, A.V. Clin. Chem., 16: 431, 1970.

SAGRILLO, C.; TAWFIK, O.W.; JOHNSON, D.C.; DEY, S.K.  
Leukotrien are necessary for decidualization in the rat.  
Biol. Reprod., 36(1 suppl): 156, 1987

SAKSENA, S.K.; LAU, I.F.; CHANG, M.C. Relationship between  
estrogen, prostaglandin F<sub>22</sub> and histamine in delayed im-  
plantation in the mouse. Acta Endocrinol., 81: 801-7, 1976

- SANANES, N ; BAULIEU, E.E. ; Le GOASCOGNE, C Prostaglandin(s) as inductive factor of decidualization in the rat uterus. Molec Cell Endocrinol, 6: 153-6, 1976.
- SCHOCHET, S S. Suggestion as to the process of ovulation and ovarian cyst formation Anat Rec, 10: 447-57, 1916
- SELAKE, M A & SMITH, J B. Platelet-activating factor- induced calcium mobilization in human platelets and neutrophils Effects of PAF-acether antagonists. J Lipid Med, 1: 125-37, 1989
- SEOW, W K ; THONG, Y H ; WATERS, M ; CUMMINS, J M Isolation of a chemotactic protein for neutrophils from human ovarian follicular fluid. Int Arch Allergy Appl Immunol, 86: 331, 1988
- SHAIKH, A A Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. Biol Reprod, 5: 247, 1971
- SHELESNYAK, M.C Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. Am J Physiol, 170: 522-7, 1952
- SILVA, P M R ; MARTINS, M A ; CORDEIRO, R.S.B. ; VARGAFTIG, B.B Edema de pata de rato induzido por PAF-aceter. Estudo de drogas antiinflamatórias. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IV São Paulo, 1986 Programas e Resumos São Paulo, 1986 p 315
- SOLOFF, M S Uterine receptor for oxytocin: effects of estrogen Biochem Biophys Res Commun, 65: 205-12, 1975
- SOLOFF, M S ; MORRISON, M J ; SWARTZ, T L The specific uptake of radioactivity from ( $^3H$ ) prostaglandins E<sub>1</sub> by rat uterus Prostaglandins, 4: 853-61, 1973
- SOMLYO, A.P. ; WALKER, J W. ; GOLDMAN, Y.E ; TRENTAN, D R ;



- KOBAYASHI, S ; KITAZAWA, T. ; SOMLYO, A V. Inositol, tri-phosphate, calcium and muscle contraction. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., 320: 399-414, 1988
- SPINKS, N.R. & O'NEILL, C. Embryo-derived platelet-activating factor is essential for establishment of pregnancy in the mouse Lancet, 10: 106-7, 1987
- SPINKS, N R & O'NEILL, C. Antagonists of embryo-derived platelet-activating factor prevent implantation of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 84: 89-98, 1988
- SPINKS, N.R.; O'NEILL, C.; RYAN, J.P.; COLLIER, M.; AMMIT, A.J. Antagonists of platelet-activating factor (PAF) and their effects on early pregnancy. In: BRAQUET, P. ed. Ginkgolides - Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives s.1., J.R. Prous Science, 1989, v.2, p. 805-20
- TAWFIK, O W. ; HIEET, Y.M. ; MALATHY, P.V. ; JOHNSON, D.R. ; DEY, S.K. Release of prostaglandins and leucotriens from the rat uterus in an lauly estrogenic response. Prostaglandins, 34(6): 805-15, 1987
- THIERSCH, J B. ; LANDA, J F. ; WEST, T.C. Transmembrane potentials in the rat myometrium during pregnancy Am. J. Physiol., 196: 901-4, 1959.
- TSAFRINI, A. ; BICCAK, T.A. ; CAJANDER, S.B. ; NY, T. ; HSUEH, A.J.W. Suppression of ovulation rate by antibodies to tissue type plasminogen activator and  $\alpha_2$  - antiplasmin. Endocrinology, 124: 415-21, 1989
- VARGAFTIG, B B & BRAQUET, P G. PAF-acether today - Relevance for acute experimental anaphylaxis Br. Med. Bull., 43(2): 312-35, 1987.
- VARGAFTIG, B B. ; CHIGNARD, M. ; BENVENISTE, J. ; LEFORT, J. ;

- WAL, F. Background and present status of research on platelet-activating factor (PAF-acether). Ann NY Acad Sci, 370: 119, 1981
- VELARDO, J.T. Action of adrenocorticotropin on pregnancy and litter size in rats. Am J Physiol, 191: 319-22, 1957
- VINEGAR, R.; TRAU, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. Federation Proc, 46: 118-26, 1987
- WATERFIELD, M.D. Growth factor receptors. Br Med Bull, 45: 541-53, 1989
- WEBER, K.H. & HEVER, H.O. Hetrzepines as antagonists of platelet activating factor. Med Res Rev, 9: 181-218, 1989
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan induced oedema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med, 111: 544-7, 1962
- WOLPE, S.D.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 members of a novel superfamily of cytokines. FASEB J, 3: 2565-73, 1989
- YASUDA, K.; SATOUCHI, K.; SAITO, K. Platelet-activating factor in normal rat uterus. Biochem Biophys Res Commun, 138(3): 1231-6, 1986