CARLY DE FARIA COELHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓXIDO NÍTRICO
ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA NO MODELO EXPERIMENTAL DE EDEMA
DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biomédicas.

São Paulo

2009

CARLY DE FARIA COELHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓXIDO NÍTRICO
ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA NO MODELO EXPERIMENTAL DE EDEMA
DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biomédicas.

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão
Lopes Martins**

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Coelho, Carly de Faria.

Avaliação do efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatória no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos / Carly de Faria Coelho. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Farmacologia e terapêutica experimental.

Versão do título para o inglês: Assessment of anti-inflammatory effects of nitric oxide administrated by inhalatory way on the experimental model of carrageenau-induced paw edema in mice.

Descritores: 1. Óxido nítrico inalatório 2. Edema de pata 3. Pleurisia 4. Carragenina 5. Camundongos I. Martins, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0194/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carly de Faria Coelho.

Título da Tese: Avaliação do efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatória no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos .

Orientador(a): Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **066** nas fls. **18** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Efeitos da administração de óxido nítrico por via inalatória no edema de pata induzido em ratos e camundongos**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Carly de Faria Coelho, Simone Aparecida Teixeira e os Pesquisadores Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Soraia Kátia Pereira Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.06.2005**.

São Paulo, 24 de junho de 2005.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Vice-Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Pedro e Toninha**, às minhas irmãs **Lívia e Júlia** pelo apoio que sempre me deram e por me respeitarem e me amarem incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela força que me foi dada para concluir o doutorado e por ter colocado ao meu redor sempre pessoas boas que nutriam essa força;

Aos meu pais, **Pedro e Toninha** e irmãs, **Livia e Júlia**, pela paciência e por estarem sempre do meu lado me apoiando nas minhas decisões;

Ao Prof. **Dr. Rodrigo A. B. L. Martins** pelo apoio, credibilidade, ensinamentos e principalmente por ter se tornado a esperança da conclusão de um ciclo;

Ao Prof. **Dr. Cristóforo Scavone** pela disposição em me auxiliar a solucionar os problemas;

À **Selma Rigonati**, secretária da Pós-graduação do Departamento de Farmacologia, pelo apoio administrativo e paciência durante esses anos de doutorado;

Aos meus amigos de laboratório, **Rodrigo Labat, Luciano Ramos, Rodney Capp, Patricia Almeida, Vanessa Godoi, Rafael P. Rossi, Sócrates Pena, Lúcio Frigo, Rodrigo Leal, Maria Carla Patrellis, Rodrigo Martins, Alexandre Denadai, Enilton Camargo, Paula Rubya, Karen Tiago** que participaram dessa aventura e me ajudaram a construir parte dessa história de vida. Gostaria de agradecer em especial a ajuda e paciência da **Dra. Simone Aparecida Teixeira**;

A **Dona Alice** pelo apoio, compreensão e pelos momentos de boas risadas;

Ao **Marco André Alves** e **Thaís Marques** (Biotério Central do ICB) pelo zelo especial com os animais do Biotério e por atenderem às minhas necessidades quando eu mais precisei;

Ao **Alexandre Urban** pelo auxílio na contagem das células e fotos das lâminas de histologia;

À **Larissa Torres** pelo auxílio com as dosagens das enzimas antioxidantes;

À **Cleusa Maria Raspantini Pellegrini** pela realização das lâminas de histologia e pela motivação na continuação do doutorado;

Ao Prof. **Dr. Marcelo Nicolás Muscará** por permitir que eu conhecesse uma nova realidade e pela oportunidade de superação;

Aos **funcionários e professores do Departamento de Farmacologia da USP**, muito obrigada;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço imensamente e mais uma vez ao **Prof. Dr. Rodrigo A. B. Lopes Martins**, às minhas amigas **Paula Campi, Ana Augusta Varriano, Ana Alice Dias, Aline Maia Dantas, Simone Marques Bolonheis, Joyce Pinto, Livia Camargo, Fabi Bento, Marina Girardi, Lud Kovalek, Rose, Irene Gouvea, Ká Teixeira, Anna Carolina Neri, Fran Toledo, Bia D'Arce, Selene Babboni, Arine Moraes, Raquel Dantas, Malú Arraes**, aos meus amigos **Marcelo Yamamoto, André Colaço e Leo Nengai**, aos meus primos-irmãos **Fernando, Rafael, Marcelo e Simone Silveira** e a minha avó **Zélia** que de maneiras diferentes estiveram sempre do meu lado, me acolheram, me deram segurança e força para seguir em frente! Fica aqui registrado minha admiração e respeito a essas pessoas especiais, as quais sem a presença, eu nada seria.

Muito obrigada!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo...

...qualquer um pode recomeçar agora e fazer um novo fim!”

(Francisco Xavier)

RESUMO

COELHO, C. F. **Avaliação do efeito anti-inflamatório do Óxido Nítrico administrado por via inalatória no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.** 102 f. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A introdução do Óxido Nítrico inalatório (iNO) como tratamento de várias doenças pulmonares, como hipertensão pulmonar do neonato, Síndrome da Angústia Respiratória Aguda e lesão por reperfusão pulmonar representa um importante avanço terapêutico em Centros de Terapia Intensiva. O iNO é classificado como microseletivo, pois é capaz de dilatar somente os vasos diretamente adjacentes às unidades alveolares que estão sendo ventiladas, porém algumas evidências apóiam que esses efeitos farmacológicos do iNO podem ir além daqueles observados sobre leitos vasculares, incluindo possível atividade anti-inflamatória. O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito anti-inflamatório do iNO nos modelos de edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina em camundongos e avançar no conhecimento dos seus possíveis mecanismos de ação. **Métodos:** O edema de pata foi induzido em camundongos Swiss, machos (20-30 g) pela injeção intraplantar de carragenina (CGN; 300 µg) sob anestesia por Halotano. A evolução do edema (mL) foi mensurada por um pletismógrafo até no máximo 12 horas após a administração de CGN. Trinta minutos depois da injeção de CGN, alguns grupos inalaram NO (300 ppm em doses e tempos variados e múltiplas administrações), enquanto outros receberam sildenafil (1 mg/Kg, i.p) ou rolipram (3 mg/Kg, i.p.) com ou sem NO. Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados e as patas injetadas foram removidas para determinar a atividade de mieloperoxidase e análise histológica por microscopia. A reação de pleurisia foi induzida pela injeção intra-torácica de carragenina. Após 04 horas os animais foram sacrificados e a cavidade pleural foi lavada com PBS e o exsudato foi coletado para avaliação do acúmulo de células inflamatórias. Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de variância ANOVA seguido do teste Student - Newman - Keuls para comparações múltiplas e teste T-Student para análise entre dois grupos. Os valores de P iguais ou inferiores de 0,05 foram considerados significantes. **Resultados:** A inalação de 13,6 ppm de NO reduziu significativamente tanto o edema de pata quando a migração celular. No modelo de edema de pata, a inalação durante 10 minutos foi mais efetiva em reduzir o edema. A mesma dose com tempos menores de inalação não apresentou o mesmo efeito. Observamos diminuição na nitração de proteínas após a administração do iNO nos parâmetros mencionados acima. Uma administração do iNO na dose e tempo ideais apresentou efeito anti-inflamatório similar aos grupos que receberam mais de uma dose. Sildenafil e rolipram administrados isoladamente reduziram de forma mais pronunciada o edema quando comparado ao tratamento com o iNO sozinho, porém quando houve a co-administração entre iNO e sildenafil houve uma potencialização no efeito anti-inflamatório quando comparado aos efeitos do NO e sildenafil sozinhos. O iNO nas doses e com tempos de inalações mais baixo também mostrou efeito anti-inflamatório na redução do acúmulo de células inflamatórias na cavidade pleural no modelo de pleurisia. **Conclusão:** O iNO foi eficaz na redução de sinais inflamatórios como edema e infiltração neutrofílica na dose de 13,6 ppm com aplicação única durante 10 minutos. A via bioquímica do GMPc parece, ao menos em parte, estar envolvida no efeito anti-inflamatório do iNO.

Palavras-chave: Óxido nítrico inalatório; Edema de pata; Pleurisia; Carragenina; Camundongos.

ABSTRACT

COELHO, C. F. **Assessment of anti-inflammatory effects of Nitric Oxide administrated by inhalatory way on the experimental model of carrageenan-induced paw edema in mice.** 102 p. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The introduction of inhaled nitric oxide (iNO) for the treatment of many pulmonary injuries, as hypertension of the newborn, adult respiratory distress syndrome and lung reperfusion injury has been one of the most significant advances in recent intensive care. Inhaled NO (iNO) is qualified as "microselective" once it dilates only the vessels directly adjacent to the alveolar units being ventilated, but some evidences support that these pharmacological effects of iNO can reach other vasculature, beyond the pulmonary vasculature. Based on these findings, this study aimed to investigate the antiinflammatory effect of inhaled nitric oxide on the mice paw edema and pleurisy induced by carrageenan in mice and advance in knowledge of its possible mechanisms of action. **Methods:** Paw edema was induced on male Swiss mice (20 – 30 g) by the subplantar injection of carrageenin (CGN; 300 µg) under halothane anesthesia. Edema time-course (mL) was measured by plethysmometry until the maximum of 12 hs following CGN administration. Thirty minutes after CGN injection, some of the animal groups inhaled NO (300 ppm at variable doses, times and multiple administrations), while others received sildenafil (1 mg/Kg, i.p) or rolipram (3 mg/Kg, i.p.) with or without NO. At the end of experiments, the animals were sacrificed and the injected paws were removed to determine mieloperoxidase activity and histological analysis by microscopy. Pleurisy reaction was induced by intratoracic injection of carrageenan. After 4 hours, animals were sacrificed and the pleural cavity was washed with PBS and then the exsudate was collected for the assessment of inflammatory cells acumulation Data are presented as mean values $\pm$ SEM. Differences among the groups were analyzed by ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons and for comparisons of 2 groups was used T-Student test. P values lower than 0.05 were taken as significant. **Results:** The 13.6 ppm inhalation of NO during 10 minutes reduced significantly the CGN-induced paw edema. The same dose on less time of inhalation did not show antinflammatory effect. We could observe a decrease in protein nitration after iNO administration on the parameters mentioned above. One administration of iNO on the greatest dose and time showed a good antiinflammatory effect equal the groups that received more than one administration. Sildenafil and rolipram administrated isolately reduced edema more than treatment with iNO alone, but sildenafil potencialized the iNO effect when co-administrated together with iNO. Moreover, iNO, on the greatest dose and time of inhalation, reduced the inflammatory cells accumulation in pleural cavity on the pleurisy model. **Conclusion:** Inhaled NO was effective in reducing inflammatory signs such as edema and neutrophil infiltration by the 13,6 ppm, with one administration, during 10 minutes. The biochemical way of cGMP seems to be involved, in part, with the anti-inflammatory effect of iNO.

Key words: Inhaled nitric oxide; Paw edema; Pleurisy; Carrageenan; Mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

AINEs- Anti-inflamatório não esteroidais

AMPC – Monofosfato cíclico 3', 5' de adenosina

Ang II – Angiotensina II

ATP – Adenosina trifosfato

AU – unidade de absorvância

BH₄ – Tetraidrobiopterina

Ca²⁺ – Íon cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CaM – Calmodulina

CGN – Carragenina

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CEEA – Comissão de Ética de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDRF – Fator Relaxante Derivado do Endotélio

E.P.M. – Erro padrão da média

FAD – Flavina-adenina dinucleotídeo

FMN – Flavina mononucleotídeo

GMPc - Monofosfato cíclico 3', 5' de guanosina

GCs – Guanilato Ciclase Solúvel

Hb-NO – Nitroso hemoglobina

HOCl – Ácido hipocloroso

HONO₂ – Ácido peroxinitroso

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hsp – Proteína do choque térmico

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN γ – Interferon-gama
IK_{Ca} – Canal de potássio de condutância intermediária
IL1 – Interleucina-1
IL1 β – Interleucina-1-beta
INDO - Indometacina
i.p. – Intraperitoneal
IRI – Isquemia e reperfusão intestinal
K⁺ - Potássio
L-arg – L-arginina
L-cit – L-citrulina
L- NAME - N^w-nitro-L-arginina metil ester
LPS – Lipopolissacarídeo
MI – medida inicial
MPO – Mieloperoxidase
metHb – Meta hemoglobina
N₂ - Nitrogênio
NADPH – Fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NO – Óxido nítrico
NO₂ – Dióxido de nitrogênio
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
iNO – Óxido nítrico inalatório
NOS – Óxido nítrico sintase
cNOS - Óxido nítrico sintase constitutiva
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
mtNOS – Óxido nítrico sintase mitocondrial
NOH-L-ARG – L-N^G-hidroxi-arginina
3-NT – 3-nitrotirosina
O₂ – Oxigênio
O₃ - Ozônio

$O_2^{\bullet -}$ – Radical ânion superóxido
OD – Densidade óptica
 $OH^{\bullet}$ – Radical hidroxila
 $ONOO^-$ – Ânion peroxinitrito
PDE – Fosfodiesterase
PDE IV – Fosfodiesterase IV
PDE V – Fosfodiesterase V
PG – Prostaglandina
 PGG_2 – Prostaglandina G_2
 PGH_2 – Prostaglandina H_2
 PGE_2 – Prostaglandina E_2
 PGF_2 – Prostaglandina F_2
 PGD_2 – Prostaglandina D_2
 PGI_2 – Prostaciclina
PMN – Polimorfonuclear
PKB – Proteína quinase B
PKG – Proteína quinase G
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SAL – Salina
SARA – Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
 SK_{Ca} – Canal de potássio de pequena condutância
SOD – Superóxido dismutase
SNC – Sistema nervoso central
SNP - Nitroprussiato de sódio
 $TNF\alpha$ – Fator de necrose tumoral-alfa
UNICAMP – Universidade de Campinas
USP – Universidade de São Paulo
V/Q – Relação ventilação perfusão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO catalisada pela NOS	22
Figura 2: Figura ilustrativa do mecanismo de ação tanto do NO endógeno como exógeno (iNO) ativando GCs, aumentando os níveis de GMPc e conduzindo a diminuição de Ca ²⁺ intracelular com consequente relaxamento muscular = vasodilatação	25
Figura 3: Figura ilustrativa da mensuração do edema de pata em camundongo por meio de um hidropletismógrafo	50
Figura 4: Sistema empregado para administração de óxido nítrico por via inalatória em roedores	51
Figura 5: Gráfico representativo da cinética da reação para cálculo da atividade de MPO, obtidas de homogenatos de amostras de pulmões de ratos	53
Figura 6: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1 ^a – 4 ^a hora), e tratamento ora com NO inalatório em diferentes doses ou Ar, durante 10 minutos de inalação, ora com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n = 8; *P<0,05 vs CGN +Ar	59
Figura 7: <i>Western blotting</i> representativo de resíduos proteicos de nitrotirosina presentes em camundongos coletadas 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina ou solução salina e tratamento com NO inalatório em diferentes concentrações. +: NTBSA: albumina de soro bovino nitrada in vitro (controle positivo)	61
Figura 8: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1 ^a – 4 ^a hora), e tratamento com NO inalatório na dose de 13,6 ppm, durante tempos variáveis de inalação(2, 5 ou 10 min) ou Ar, durante 10 minutos de inalação; tratamento com indometacina (Indo; 5 mg/Kg, i.p.), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n = 6; *P<0,05, **P<0.01 e ***P<0,001 vs CGN +Ar	62
Figura 9: <i>Western blotting</i> representativo para expressão proteica de nitrotirosina em patas esquerdas de camundongos retiradas ao final do experimento, na 4 ^a hora. Efeito do tratamento com NO inalatório na concentração de 13,6 ppm em diferentes tempos de inalação	63
Figura 10: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1 ^a – 12 ^a hora), tratamento com	

NO inalatório na doses de 13,6 ppm ou Ar, durante 10 minutos de inalação, em múltiplas administrações (30 min, 4 hs ½ e 8 hs ½); tratamento com indometacina (Indo; 5 mg/Kg, i.p.), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 µg) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos. Os dados foram expressos em médias ± EPM, n = 6; **P<0.01 e **P<0,001 vs CGN +Ar 64

Figura 11: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1ª – 4ª hora), tratamento com NO inalatório na doses de 13,6 ppm ou Ar, durante 10 minutos de inalação, em única administração, ora com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 µg) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos, ora com sildenafil (1 mg/Kg; i.p.) injetado imediatamente após a injeção de CGN e associação entre iNO e sildenafil. Os dados foram expressos em médias ± EPM, n=5 * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 vs CGN + ar; # P<0,05 e ## P<0,01 vs CGN + NO; ++ P<0,01 vs CGN + sildenafil 65

Figura 12: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1ª – 4ª hora), e tratamento ora com NO inalatório na doses de 13,6 ppm ou Ar, durante 10 minutos de inalação, em única administração, ora com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 µg) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos, ora com rolipram (3 mg/Kg; i.p.) injetado imediatamente após a injeção de CGN e associação entre iNO e rolipram. Os dados foram expressos em médias ± EPM, n=5 * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 vs CGN + ar; # P<0,05, ## P<0,01 e ### P < 0,001 vs CGN + NO 67

Figura 13: Efeito do NO inalatório (13,6 ppm) ou Ar, durante 10 minutos de inalação ou Indometacina (Indo; 5 mg/Kg) na migração de neutrófilos nas patas. **Painel A:** Atividade de MPO presente em patas de camundongos após 4 horas da indução do edema por carragenina (CGN; 300 µg) e tratamentos com NO/Ar ou Indometacina . **Painel B:** Contagem de neutrófilos em amostras histológicas de patas de camundongos submetidos a indução do edema de pata por carragenina CGN; 300 µg) e tratamentos com NO/Ar ou Indometacina. Os dados foram expressos como média ± EPM para um n=6/grupo. * P<0,05, ** P<0,01*** e P<0,001 vs CGN + Ar 69

Figura 14: Fotomicrografia das lâminas histológicas das patas dos camundongos, coradas por HE, 4 horas depois do edema de pata induzido por carragenina. **Painel A:** Inoculação de salina na pata posterior de camundongo e tratamento com Ar (10 minutos de inalação), 30 min depois da injeção de salina. **Painel B:** Inoculação de carragenina (CGN; 300 µg) na pata posterior de camundongo e tratamento com Ar (10 minutos de inalação), 30 min depois da injeção de CGN. **Painel C:** Inoculação de carragenina (CGN; 300 µg) na pata

posterior de camundongo e tratamento com NO inalatório (13, 6 ppm, durante 10 minutos de inalação, única dose), 30 min depois da injeção de CGN. **Painel D:** Inoculação de carragenina CGN; 300 µg) na pata posterior de camundongo e tratamento com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de CGN 71

Figura 15: Contagem de leucócitos totais em lavado bronco alveolar após administração de carragenina pela injeção intrapleural. **Painel A:** Efeito do NO inalatório, administrado em diferentes doses, sobre o acúmulo total de leucócitos. **Painel B:** Efeito do NO, na dose de 13,6 ppm, administrada em tempos diferentes de inalação, sobre o acúmulo total de leucócitos.73

Figura 16: Contagem de células mononucleares em lavado bronco alveolar após administração de carragenina pela injeção intrapleural. **Painel A:** Efeito do NO inalatório, administrado em diferentes doses, sobre o acúmulo de células mononucleares. **Painel B:** Efeito do NO, na dose de 13,6 ppm, administrada em tempos diferentes de inalação, sobre o acúmulo de células mononucleares.75

Figura 17: Contagem de neutrófilos em lavado bronco alveolar após administração de carragenina pela injeção intrapleural. **Painel A:** Efeito do NO inalatório, administrado em diferentes doses, sobre o acúmulo de neutrófilos. **Painel B:** Efeito do NO, na dose de 13,6 ppm, administrada em tempos diferentes de inalação, sobre o acúmulo de neutrófilos.....77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Óxido Nítrico (NO)	20
1.1.1 A Descoberta do NO	20
1.1.2 Características químicas e biossíntese do NO	21
1.1.3 Isoformas de NOS	23
1.1.4 Mecanismos de ação do NO	24
1.1.5 Atividade biológica do NO	27
1.2 NO inalatório (iNO) e sua utilização terapêutica	28
1.2.1 Efeitos do iNO na terapêutica experimental	30
1.2.2 Doses de iNO utilizadas na clínica	31
1.2.3 Toxicidade do iNO	32
1.2.4 Efeitos do iNO em outros tecidos além do leito vascular pulmonar	34
1.3 O NO e a Inflamação	35
1.4 O Óxido Nítrico Inalatório e a Reação Inflamatória	37
1.5 A Reação Inflamatória	38
1.6 Mediadores Químicos do Processo Inflamatório	39
1.6.1 Aminas Vasoativas	39
1.6.2 Sistema de Cininas	41
1.6.3 Metabólitos do Ácido Araquidônico (AA): Prostaglandinas e Leucotrienos	41
1.7 Vasos Linfáticos na Inflamação	42
1.8 O Uso da Carregina como Agente Flogógeno	42
1.9 Eventos Vasculares e Formação de Edema	44
1.10 Hipótese	47
2 OBJETIVO	48
3 MATERIAIS E MÉTODO	49
3.1 Edema de Pata.	49
3.1.1 Animais	49
3.1.2 Indução do Edema de Pata	49
3.1.3 Tratamento com NO inalatório	50
3.1.4 Tratamentos com inibidores de fosfodiesterases	52

3.1.5 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase	52
3.1.6 Análise histomorfológica das patas de camundongos	53
3.1.7 Ensaio de expressão protéica	54
3.1.7.1 <i>Western Blotting</i>	54
3.2 Pleurisia	55
3.2.1 Animais	56
3.2.2 Indução da Pleurisia	56
3.2.3 Contagem de Células Inflamatórias	57
3.2.4 Contagem Diferencial de Leucócitos	57
3.3 Análise estatística	57
4 RESULTADOS	58
4.1 Efeito de diferentes doses de NO inalatório no edema de pata induzido por carragenina em camundongos	58
4.2 Detecção por Western blotting de proteínas nitradas em resíduos de tirosina em patas de camundongos coletadas 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina. Efeito do tratamento com diferentes doses de NO inalatório	60
4.3 Determinação do melhor tempo de inalação	61
4.4 Efeito do tratamento com diferentes tempos de exposição ao NO inalatório sobre a nitração de proteínas	62
4.5 Determinação da Posologia	63
4.6 Efeito dos tratamento concomitantes entre NO inalatório e o inibidor de fosfodiesterase V, sildenafil	64
4.7 Efeito dos tratamento concomitantes entre NO inalatório e o inibidor de fosfodiesterase IV, rolipram	66
4.8 Efeito do NO inalatório no acúmulo neutrofílico no edema de pata em camundongos	67
4.9 Fotomicrografia de lâminas histológicas de patas de camundongos depois da inoculação com carragenina ou salina	70
4.10 Efeito do NO inalatório no acúmulo de leucócitos total no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	72
4. 11 Efeito do NO inalatório no acúmulo de células mononucleares no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.	74

4.12 Efeito do NO inalatório no acúmulo de neutrófilos no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	76
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óxido Nítrico (NO)

1.1.1 A Descoberta do NO

Até o final da década de 70 do século XX, o NO era considerado, somente um poluente atmosférico, que participava da chamada chuva ácida, dos mecanismos de destruição da camada de ozônio e da formação de alguns compostos carcinogênicos (CHATKIN, 2000).

Em 1980, Furchgott e Zawadski demonstraram que o relaxamento induzido pela acetilcolina em preparações de artérias isoladas de coelho, pré-contraídas com noradrenalina, era estritamente dependente da integridade da camada endotelial vascular.

Os primeiros estudos foram realizados utilizando-se aorta de coelhos, mas logo foi confirmado para inúmeras espécies de mamíferos. A ação da acetilcolina sobre seu receptor na célula endotelial resultaria na liberação de um fator ou fatores, que agiriam sobre as células musculares lisas da parede das artérias, produzindo então, vasodilatação (FURCHGOTT e ZAWADSKI, 1980; FURCHGOTT, 1981), inicialmente denominado como Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF - *Endothelium-Derived Relaxing Factor*).

O Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio foi, mais tarde, quimicamente identificado como Óxido nítrico (NO) (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987). Dentre os mediadores biológicos capazes de induzir liberação de EDRF (óxido nítrico), destacam-se, além da acetilcolina, a bradicinina (CHERRY et al., 1982), substância P (ZAWADZKI et al., 1981), serotonina (COCKS e ANGUS, 1983), histamina (TODA, 1984) e trombina (DE MEY et al., 1982).

Em 1987, Palmer, Ferrige e Moncada descobriram que tanto esse fator relaxante derivado do endotélio quanto o óxido nítrico exerciam efeitos biológicos semelhantes: ambos eram instáveis, promoviam vasodilatação, e suas ações eram neutralizadas pela hemoglobina e potencializadas pela superóxido dismutase

(SOD). Dessa forma, foi confirmado que o EDRF e o NO eram, de fato, a mesma substância (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987).

Assim, a descoberta do NO foi de extrema importância para o campo da pesquisa biomédica, uma vez que modificou paradigmas vigentes até então, que colocavam o endotélio vascular como uma simples barreira física à difusão de substâncias entre o sangue circulante e o espaço intersticial.

Desde então, o endotélio vascular tem sido considerado um dos maiores órgãos endócrinos, metabolicamente ativo que, em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos, sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo, desempenhando papel fundamental na regulação da circulação (CARVALHO et al., 2003).

1.1.2 Características químicas e biossíntese do NO

O NO é uma pequena molécula lipofílica gasosa, capaz de difundir-se facilmente através das membranas biológicas. Trata-se, na verdade, de um radical livre, extremamente reativo dentre uma série de óxidos de nitrogênio, que pode reagir com outros radicais, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas do que a molécula original (BRUCKDORFER, 2005).

O NO é biossintetizado a partir do aminoácido L-arginina (L-arg), através da ação de Óxido Nítrico Sintases (NOS). Tais enzimas catalisam uma série de eventos óxido-redutivos, onde, inicialmente a L-arg é oxidada ao intermediário N^G-hidroxi-L-arginina (NOH-L-arg), que posteriormente é convertido em L-citrulina (L-cit) e NO. Ambos os passos requerem oxigênio molecular (O₂) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) como substratos, além de tetraidrobiopterina (BH₄), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), proteína do choque térmico, ferroprotoporfirina IX (heme) e calmodulina/Ca²⁺ como cofatores, os quais se ligam a sítios específicos das enzimas no processo de transferência de elétrons (REID, 1998; BARRETO et al., 2005; ARUL e KONDURI, 2009; Figura 1).

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, a sua síntese em neonatais e crianças é considerada insuficiente para suprir as necessidades orgânicas dessas faixas etárias, no entanto, a L-arginina é um aminoácido não essencial em indivíduos adultos saudáveis (BORGES, 1990). Mesmo o organismos podendo, normalmente, sintetizar a L-arginina em quantidades adequadas, sob determinadas condições, a ingestão deste aminoácido pode ser favorável para o crescimento ótimo de certos mamíferos (VAN BUREN et al., 1990).

Em hospitais, a L-arginina pode ser prescrita para fins terapêuticos na forma de peptídeos, tripeptídeos ou, ainda, ionizada. Esse aminoácido tem sido relacionado ao aumento da imunidade, através do aumento da produção de hidroxiprolina e da função dos linfócitos-T. De acordo com Curley et al. (2003) e WU et al. (1998) (*apud* NOVAES e BEAL, 2004) o aumento parece estar relacionado à maior liberação do hormônio do crescimento, que agiria por meio do ganho de massa muscular e pela melhora da resposta cicatricial em feridos.

Figura 1: Oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO catalisada pela NOS.
Fonte: BARRETO et al., 2005 (adaptado).

1.1.3 Isoformas de NOS

Inicialmente foram identificadas três isoformas de NOS, duas das quais são constitutivas, dependentes de cálcio e produzem NO em pequenas concentrações. A outra isoforma, é independente de cálcio e induzível por diversos estímulos imunológicos ou inflamatórios (KNOWLES e MONCADA, 1994). A NOS constitutiva (cNOS), presente no cérebro, medula espinhal e sistema nervoso periférico, foi designada de nNOS (NOS-1), enquanto a isoforma primeiramente descoberta no endotélio vascular, foi designada como eNOS; e aquela induzida por estímulo imunológico ou inflamatório é conhecida como iNOS (MONCADA et al., 1997). Outras isoformas também foram recentemente descritas como a mtNOS, encontrada nas mitocôndrias de diversos tipos celulares.

A nNOS é a principal isoforma expressa em neurônios; tem sido encontrada em astrócitos de ratos, adventícia de vasos sanguíneos encefálicos de ratos bem como em miócitos cardíacos de ratos (ZHOU e ZHU, 2009).

A eNOS é a principal isoforma expressa nas células endoteliais onde é predominantemente localizada na região perinuclear, e em regiões da membrana plasmática denominadas cavéolas. Nesse contexto, a caveolina, uma proteína presente na cavéola, interage com a eNOS inibindo-a. Esta inibição é antagonizada pelo complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, levando à proposta do “ciclo da caveolina” de ativação/inativação e re-localização da enzima (DUDZINSKI et al., 2006).

A ativação fisiológica da eNOS ocorre por um aumento na concentração intracelular de íons Ca^{2+} , induzido por agonistas como a acetilcolina, catecolaminas, ATP, substância P e angiotensina II (Ang II) (PALMER et al., 1988).

A ativação da eNOS pode também acontecer independentemente do aumento na concentração de Ca^{2+} por mecanismos dependentes de tirosina quinases sem o requerimento de agonistas para esses receptores. Esse processo pode ser induzido por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (*shear stress*) produzido pela força mecânica do turbilhonamento sanguíneo, que através da proteína quinase B (PKB) fosforila diretamente a eNOS, ativando-a (BRUCKDORFER, 2005).

A iNOS está presente na maioria das células de mamíferos e geralmente é induzida em processos inflamatórios. Sua atividade é independente do aumento da concentração de cálcio intracelular, e resulta na produção de NO durante períodos prolongados (KNOWLES e MONACADA, 1994). A maioria dos estudos que avaliam a função do NO na inflamação tem examinado a indução da iNOS durante esse processo por citocinas inflamatórias. Especificamente, lipopolissacarídeos (LPS), Interferon- γ (IFN – γ), interleucina – 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) podem induzir a expressão de iNOS em macrófagos dentro de uma hora de exposição (HANAFY et al., 2001).

Existem evidências de uma quarta isoforma de NOS, encontrada em mitocôndrias (mtNOS) a qual desempenha papel modulador do consumo de O_2 , da produção de ATP e geração de radicais livres pela mitocôndria (GIULIVI et al., 1998; GHAFOURIFAR et al., 2008). Esta enzima também é dependente de Ca^{2+} assim como a eNOS e a nNOS, porém sua atividade tem sido demonstrada em mitocôndrias isoladas de vários órgãos como fígado, coração, cérebro e rins. O NO derivado dessa isoforma apresenta numerosas funções incluindo: regulação da respiração mitocondrial, do potencial transmembrana, da retenção de Ca^{2+} , da síntese de ATP e da apoptose via mitocondrial (GHAFOURIFAR et al., 2008).

1.1.4 Mecanismos de ação do NO

O NO é capaz de permear rapidamente através de membranas biológicas, conforme mostrado na Figura 2, o que lhe confere uma grande capacidade de poder interagir rapidamente, após sua liberação, com a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) localizada em células próximas, resultando em aumento das concentrações de monofosfato cíclico 3', 5' de guanosina (ou GMP cíclico - GMPc). Este, por sua vez, estimula a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), a qual pode fosforilar diversas proteínas (MONCADA et al., 1991; ARUL e KONDURI, 2009). Por exemplo, em relação à musculatura lisa vascular, a PKG pode ativar canais para K^+ , induzindo hiperpolarização, ou estimular a saída de Ca^{2+} do citoplasma da célula, levando à vasodilatação. A PKG pode, igualmente, diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} , diminuindo a contração muscular (MONCADA et al.,

1991) (Figura 2). A ativação de canais para K^+ diretamente pelo NO sem envolver a participação do GMPc também tem sido descrita (FERNANDES et al., 2002).

Figura 2: Figura ilustrativa do mecanismo de ação tanto do NO endógeno como exógeno (iNO) ativando GCs, aumentando os níveis de GMPc e conduzindo a diminuição de Ca^{2+} intracelular com consequente relaxamento muscular = vasodilatação. (Gentilmente desenhada por André Luiz Colaço).

O NO é rapidamente inativado em combinação com a hemoglobina no sangue para formar hemoglobina nitrosilada e então oxidada em methemoglobina e nitratos e nitritos inorgânicos (ARUL e KONDURI, 2009).

A interrupção da sinalização mediada pelos nucleotídeos cíclicos, como GMPc, ocorre por uma família de enzimas de 21 genes denominadas fosfodiesterases (PDEs) (HOUSLAY, 1998). As PDEs tem sido agrupadas em 11 isoenzimas diferentes primárias (total de 48 isoformas), baseadas na afinidade pelo substrato, seletividade e mecanismos de regulação. Dessas enzimas, a PDE-5,

PDE-6 e PDE-9 são altamente seletivas para GMPc; a PDE-1, PDE-2 e PDE-11 tem afinidade dupla para ambos os substratos, a PDE-3 e PDE-10 são sensíveis a GMPc, porém seletivas para AMPc (KASS et al., 2007) e a PDE-4 apresenta-se altamente seletiva para AMPc (LAEMONT et al., 1999; ARUL e KONDURI, 2009).

Devido a essa ampla diversidade e papel chave no controle da sinalização dos nucleotídeos cíclicos, as famílias de PDEs tornam-se alvos farmacológicos atrativos. Recentemente, inibidores dessas enzimas tem sido sintetizados. Dentre eles, destacam-se o citrato de sildenafil (Viagra[®]), um inibidor da PDE-5 (enzima responsável pela degradação de GMPc) que tem sido utilizado para o tratamento de disfunção erétil (CORBIN et al., 2002) e de doenças pulmonares (TOWARD et al., 2004), e o Rolipram, um inibidor da PDE-4 (enzima responsável pela degradação de AMPc), que também tem sido utilizado como agente anti-inflamatório (GONÇALVES DE MORAES et al., 1998).

Entretanto, a interação com GCs não é suficiente para elucidar a ampla variedade de atividades alcançadas pelo NO. Dessa forma, investigadores tem começado a explorar como modificações pós-transducionais de proteínas mediadas pelo NO podem representar mecanismos de sinalização intracelular. Estas modificações incluem não só a ligação com centros metálicos; mas a nitrosilação com grupos tióis e amino; nitração de tirosina, triptofano, amina, ácido carboxílico e grupos fenilalanina; além da oxidação de tióis. Dentre esses mecanismos, a nitrosilação de tióis e a nitração de resíduos de tirosina têm recebido maior atenção (GOW et al., 2004).

O NO tem se mostrado capaz de nitrosilar um número de sítios nucleofílicos em proteínas (GOW et al., 2004), formando interações covalentes relativamente estáveis com proteínas que apresentem grupamentos sulfidril livres (-SH) e também com tióis que contém aminoácidos, como a cisteína, determinando o processo da S-nitrosilação, o qual forma nitrosotióis, e tem sido implicado no controle de uma ampla gama de funções proteicas e de atividades celulares (FOSTER et al., 2003).

Esses nitrosotióis, como a S-nitrosocisteína, S-nitrosoglutationa ou S-nitrosoalbumina são capazes de liberar o NO em contato com as células e assim exibir propriedades similares a do NO sozinho (BRUCKDORFER, 2005).

Uma das múltiplas modalidades de sinalização usadas pelas espécies derivadas do NO para a regulação da estrutura proteica e desempenho de suas funções é a nitração de resíduos de tirosina, que resultam no acúmulo de 3-nitrotirosina (3-NT) em proteínas, tornando esse composto um marcador de estresse nitrosativo em células e tecidos. Por exemplo, uma ampla gama de evidências tem associado o acúmulo de 3-NT em doenças principalmente neurológicas e cardiovasculares que usam a inflamação como um contribuidor para a patogênese (NURIEL et al., 2008).

Esse acúmulo de 3-NT associado ao processo inflamatório é formado predominantemente pela reação do ONOO^- que reage com o grupamento fenol da tirosina resultando em nitrotirosina (HANAFY et al., 2001). Desse modo, esse composto, serve como um marcador útil de medida da gravidade e progressão do processo inflamatório após a exposição tecidual com as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (NURIEL et al., 2008), além de desempenhar funções celulares (HANAFY et al., 2001).

1.1.5 Atividades biológicas do NO

O NO é um importante mensageiro de vários sistemas biológicos. Por exemplo, o NO liberado pelas células endoteliais e o NO produzido pelos nervos não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) causam importante vasodilatação, que contrabalança a vasoconstrição produzida pelo sistema nervoso simpático e sistema renina angiotensina, sendo, portanto, de grande importância para a regulação do tônus vascular (GALLEY e WEBSTER, 2004).

O NO sintetizado nos neurônios do SNC age como neuromediador em muitas funções fisiológicas, incluindo a formação de memória, potencialização e depressão de longo prazo (LTP e LTD) no hipocampo e cerebelo, coordenação entre as atividades neuronais e fluxo sanguíneo, modulação da nocicepção, regulação da liberação de neurotransmissores em muitas áreas do cérebro, controle do sono, termorregulação, e ainda como um mensageiro retrógrado que regula a eficácia sináptica no SNC (JOCKUSH et al., 1995; HYNES, 1999). Apesar do papel do NO em diversas funções fisiológicas dentro do SNC, sua liberação excessiva pelos neurônios tem implicação fisiopatológica em muitas doenças

neurodegenerativas e na isquemia cerebral, por meio da formação de espécies reativa de nitrogênio (ERNs) (CALABRESE et al., 2007).

Já no sistema nervoso periférico (SNP), o NO funciona como um neurotransmissor NANC que medeia, por exemplo, o relaxamento do músculo liso nos tratos gastrointestinal e urogenital (ALPIN et al., 1998).

Em adição ao seu papel fisiológico como uma molécula mensageira no SNC e SNP, o NO também é citotóxico em concentrações anormalmente altas (HUMPHRIES e NEWHAM, 1998), atuando na defesa do hospedeiro e reações imunológicas (KEELY et al., 1998; PARISE et al., 2000). Nesse contexto, a geração do NO foi primeiramente observada em macrófagos ativados (JULIANO, 2002; SPRINGER, 1994), onde contribui para a citotoxicidade contra células tumorais, bactérias, vírus e outros microorganismos. As ações citostáticas/citotóxicas do NO resultam de sua ação inibitória nas enzimas chaves da cadeia respiratória e na síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) nas células alvo (PHILLIPS et al., 1991; SHATTIL et al., 1998). Essa ação pode ser direta ou através da formação de espécies reativas, e produz falência energética, lesão ao DNA e desencadeia a apoptose. Importante ressaltar que diversas doenças caracterizam-se pela produção aumentada de NO, como o choque séptico, doenças neurodegenerativas e auto-imunes (BARRETO et al., 2005).

1.2 O Óxido Nítrico inalatório (iNO) e sua utilização terapêutica

A introdução do iNO como tratamento de doenças pulmonares tem sido, sem dúvida, um dos mais significantes avanços em centros hospitalares, principalmente nas unidades de terapia intensiva nos últimos anos (PORTA e STEINHORN, 2008).

O início da sua utilização ocorreu com sua introdução para o tratamento da hipertensão pulmonar em recém-nascidos (KINSELLA et al., 1993) e em adultos com desconforto respiratório como manifestação da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (KAVANAGH e PEARL, 1995). Desde então, o papel terapêutico do iNO tem sido estudado numa variedade de distúrbios envolvendo o leito vascular pulmonar que incluem:

- a) hipertensão pulmonar primária;

- b) hipertensão pulmonar persistente do neonato;
- c) insuficiência cardíaca congestiva;
- d) doença pulmonar intrínseca, incluindo fibrose pulmonar e doença pulmonar obstrutiva crônica;
- e) síndrome da angústia respiratória aguda (SARA);
- f) sepse;
- g) doenças que podem causar alteração na relação ventilação-perfusão (V/Q) pulmonar, diminuição no débito cardíaco por sobrecarga de ventrículo direito que conduzem ao quadro de hipóxia (KLINGER, 2002; MILLER e RHINE, 2008).

Em recém nascidos prematuros, o iNO apresenta benefícios a curto e a longo prazo, segundo o estudo de Arul e Konduri (2009), onde vasodilatação pulmonar seletiva, melhora na relação ventilação-perfusão, diminuição do acúmulo e ativação neutrofílica e melhora da oxigenação na falência respiratória por hipóxia são os benefícios verificados a curto prazo e redução do uso de oxigênio e diminuição do estresse oxidativo, melhora da função do surfactante, diminuição da resistência das vias aéreas e melhora do crescimento pulmonar devido a estimulação da angiogênese e alveolarização.

Por muito anos, fármacos vasodilatadores ou combinações de drogas vasoativas, incluindo o nitroprussiato de sódio, nitroglicerina, tolazolina, hidrazalina, isoproterenol e prostaciclina têm sido utilizados para o tratamento da hipertensão pulmonar, por serem capazes de promover vasodilatação das artérias pulmonares. No entanto nenhum desses agentes é satisfatoriamente seletivo e apresentando a capacidade de produzir efeitos sistêmicos, como por exemplo a dilatação arterial em diferentes leitos vasculares. Por outro lado, o óxido nítrico exógeno, uma vez que alcança o alvéolo, é capaz de se difundir por entre as células epiteliais, alcançando rapidamente as células da musculatura lisa. Desta forma, é capaz de mimetizar os efeitos do óxido nítrico endógeno, aumentando os níveis de GMPc e causando o relaxamento desta musculatura lisa vascular. Uma vez na luz do vaso sanguíneo, o NO rapidamente reage com a hemoglobina sendo complexado a esta e consequentemente inativado. Esta característica de meia vida curta permite uma resposta vasodilatadora local, evitando efeitos indesejáveis como por exemplo, vasodilatação sistêmica (LUNN, 1995).

Essa seletividade relativa do óxido nítrico exógeno inalado gerou entusiasmo na comunidade clínica, por tratar-se, aparentemente, de uma terapia segura e efetiva (TRONCY et al., 1997). Além disso, o iNO possui vários efeitos potencialmente benéficos na manutenção da função pulmonar mantendo os níveis da pressão pulmonar arterial baixos e sustentando a normalidade da permeabilidade vascular (WANG et al., 2003).

Os efeitos da inalação do NO encontram-se há algum tempo sob intensa investigação clínica, pois apesar de estudos reportarem efeitos benéficos, seu impacto sobre o prognóstico de uma doença ainda não está bem estabelecido.

1.2.1 Efeitos do iNO na terapêutica experimental

Em modelos experimentais com animais, como por exemplo o modelo de lesão aguda de pulmão induzida por mecônio em ratos, o iNO também é utilizado como objeto de estudos, avaliando-se a resposta inflamatória pulmonar, apoptose, peroxidação lipídica e nitração de proteínas. Lu et al. (2005) identificaram que o grupo de animais tratados com iNO apresentou redução na atividade de mieloperoxidase associada à redução no número de neutrófilos no lavado broncoalveolar, além da diminuição da expressão da iNOS e da IL-1 β , quando comparado ao grupo sem tratamento. Porém, o tratamento com inalação de NO não diminuiu a formação de nitrotirosina e nem a formação de malondialdeído (indicador de peroxidação lipídica) e apoptose. Dessa forma, os autores puderam concluir que a inalação de NO pode proteger o tecido pulmonar da inflamação induzida por mecônio e que os efeitos oxidantes desse composto não foram clinicamente significantes.

No mesmo sentido, Waisman et al. (2005), estudando as alterações pulmonares provenientes da isquemia e reperfusão em ratos, verificaram que o iNO foi capaz de diminuir significativamente a migração de leucócitos, além de atenuar o extravasamento de proteínas plasmáticas e diminuir o fluxo sanguíneo (e consequentemente a força de turbilhonamento) na parede capilar pulmonar quando comparado com os animais isquêmicos que não receberam tal tratamento. Estes achados sugerem que a terapia com NO inalatório antes da reperfusão pode atenuar a resposta inflamatória pulmonar ou a conhecida lesão de reperfusão.

1.2.2 Doses de iNO utilizadas na terapêutica clínica e experimental

Uma detalhada revisão bibliográfica mostra doses e tempos de inalação dos mais variados, utilizados clinicamente como terapia com o iNO. Este conjunto de diferentes doses e diferentes tempos de inalação resulta, obviamente, em uma ampla variedade de efeitos. Por outro lado, é nítida a sua indicação como alternativa de tratamento para doenças pulmonares tanto em humanos adultos quanto em crianças, assim como em experimentos laboratoriais com animais, permitindo observar efeitos além do tecido pulmonar (WEINBERGER et al., 2001).

Não se conhece a concentração mínima alveolar de NO inalado necessária para causar dilatação do leito vascular pulmonar em humanos, mas foi verificado que concentrações tão baixas quanto uma (1) parte por milhão (ppm) na mistura do gás inalado pode causar vasodilatação.

Em 1996, Zapol verificou que concentrações tão baixas quanto 250 partes por bilhão (ppb) de NO foram efetivas para a indução de vasodilatação em alguns pacientes. De acordo com Wang et al. (2003), 80 ppm de NO inalado parece uma dose ideal como forma de terapia e acima de 100 ppm considera-se uma dose alta, aumentando o risco de danos celulares e teciduais devido a toxicidade do NO. Finer e Barrington (2000) concordam dizendo que tanto em adultos quanto em crianças, doses abaixo de 100 ppm de NO, formam concentrações insignificantes de meta-hemoglobina (metHb).

No estudo de Mathru et al. (2007) foi demonstrado que a administração de iNO em uma concentração de 80 ppm reduziu significativamente a inflamação causada por situação de isquemia e reperfusão por uso do torniquete, durante cirurgia de joelho em humanos. Estes achados suportam a idéia de que em doenças caracterizadas pela disfunção do metabolismo do NO, o iNO pode ser uma terapia efetiva para o restabelecimento do NO sistêmico. Por outro lado, o estudo de Matalon et al. (1996) utilizando-se de ovelhas e ratos que inalaram 80 ou 100 ppm de NO, doses que o grupo considerou como altas, reduziram a habilidade de agregação lipídica, *in vitro*, resultando em dano ao surfactante e conseqüentemente reduzindo a capacidade de diminuição da tensão superficial intra-alveolar.

Segundo Kinsela (2008) a dose de iNO inicial em crianças recém-nascidas deve ser de 20 ppm sugerindo reduções da dose sempre que houver oportunidade,

visto que a toxicidade é aparente na dose de 80 ppm, causando aumento de metHb, dióxido de nitrogênio (NO₂) inspirado e tempo prolongado de hemorragia.

Por outro lado, curtos períodos de inalação podem ser mais benéficos, visto que as concentrações de metabólitos de NO acumuladas tem a capacidade de atingir tecidos alvo, mesmo distantes do local de administração. A rápida inalação (30 min) de NO a 80 ppm promoveu melhora na oxigenação de pacientes recém-nascidos com hipertensão pulmonar persistente (ROBERTS et al., 1992). Esses efeitos protetores parecem ser atribuídos aos metabólitos que são rapidamente transportados via corrente sanguínea, advindos do pulmão, promovendo cardioproteção após lesão por isquemia e reperfusão (NAGASAKA et al., 2008).

A exposição prolongada ao iNO pode ser um dos fatores importantes na promoção de toxicidade, promovendo apoptose celular tubular nos rins conforme apresentado no estudo, onde cobaias que inalaram 40 ppm de NO por 30 horas apresentaram aumento na expressão da óxido nítrico sintase induzida. Desta forma, ocorreu aumento das concentrações de NO nos rins, sugerindo que este seja um dos fatores causadores de apoptose. Por outro lado, baixas concentrações poderiam ser protetoras já que esses efeitos desaparecem com 12 horas de exposição (GOZDZIK et al., 2008).

Entretanto, Miller et al. (2009) apostam no uso de altas doses de iNO (160 ppm), com curtos períodos de exposição (30 min) e de forma intermitente (a cada 4 horas) com o objetivo de produzir efeitos antimicrobicidas contra patógenos associados a doenças pulmonares infecciosas, porém preservando as propriedades não-tóxicas do iNO, ou seja, com menor produção de metHb e NO₂ (níveis abaixo de 2 ppm).

1.2.3 Toxicidade do iNO

A toxicidade do iNO parece estar associada a formação de metHb, NO₂ e peroxinitrito (ONOO⁻; WANG et al., 2003), conforme esquema abaixo:

A seletividade do iNO à vasculatura pulmonar se dá devido sua fixação ao grupamento heme da molécula de hemoglobina depois de passar pela parede dos vasos pulmonares e cair na corrente sanguínea. Dessa forma, o NO é então oxidado a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) e a hemoglobina é transformada em metHb, a qual é secundariamente reduzida a hemoglobina novamente pela hemoglobina redutase. Porém quando as concentrações de iNO extrapolam seus efeitos benéficos podem surgir a methemoglobinemia, com queda na saturação de O_2 dando origem ao sinais clínicos como cianose e dispnéia, aumentando o risco de danos celulares e até morte (WANG et al., 2003). A metHb inibe diretamente a função do surfactante in vivo (HALLMAN et al., 1996).

O NO_2 é um gás oxidante que polui o ar ambiente em vários locais urbanos e industriais e em ar de ambientes fechados com aplicativos de combustão. O primeiro local de lesão depois da inalação com o NO_2 são os bronquíolos e os alvéolos. Assim como o Ozônio (O_3), o NO_2 causa dano oxidativo que resulta em formação de radicais livres que podem oxidar aminoácidos e iniciar peroxidação lipídica principalmente de membrana celular pulmonar e afeta adversamente a eficiência na defesa pulmonar alterando o clearance mucociliar, os macrófagos alveolares e o sistema imune (TRONCY et al., 1997).

A toxicidade do iNO também pode ser mediada pelo ONOO^- . Esse radical surge pela união do NO e ânion superóxido (O_2^-), o qual em pH neutro é protonado rapidamente forma o ácido peroxinitroso (HONO_2). O HONO_2 por sua vez é instável e se decompõe rapidamente, produzindo NO_2 , radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e NO_3^- . Com base na química envolvida na reação do NO com superóxido, fica evidente que a produção de ONOO^- , HONO_2 e seus produtos de decomposição $\text{OH}^\cdot$ e NO_2 , que são espécies altamente oxidantes, podem ser extremamente danosas às biomoléculas de forma geral, haja visto que são capazes de oxidar tióis e bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA) (BARRETO et al., 2005).

Sabe-se que essa espécie também altera a atividade do surfactante e pode causar lesões na mucosa epitelial das vias aéreas (TRONCY et al., 1997), porém a toxicidade do ONOO^- é de extrema importância para a resposta imunológica já que as células de defesa, como neutrófilos e macrófagos, produzem este radical para liquidar agentes agressores (LEFER et al., 1997)

1.2.4 Efeitos do iNO em outros tecidos além do leito vascular pulmonar

Evidências sugerem que os efeitos farmacológicos do iNO podem estender-se além da vasculatura pulmonar e são atribuídos a complexos derivados do NO no sangue que podem orquestrar efeitos anti-inflamatórios (MATHRU et al., 2007).

Há algum tempo sabe-se que pelo fato do NO poder nitrosar ou nitrosilar proteínas para formar derivados contendo NO (por exemplo, S-nitrosotióis), pode haver à ocorrência de efeitos periféricos uma vez que estes compostos preservam a bioatividade e aumentam o tempo de meia vida do NO nos sistemas biológicos (JIA et al., 1996).

Estas evidências tornam-se mais fortes a cada dia, podendo desta forma justificar o uso terapêutico do NO inalatório não só no tratamento de lesões exclusivamente pulmonares, como também de outros distúrbios da vasculatura e tecidos periféricos (NG e KUBES, 2003; GOZDZIK et al., 2008).

Fox-Robichaud et al. (1998) verificaram pela primeira vez que em leitos periféricos (mesentério de gato) o iNO foi capaz de reverter a vasoconstrição e diminuir o recrutamento leucocitário somente no modelo de isquemia e reperfusão, caracterizado por perfusão pobre, recrutamento leucocitário abundante e disfunção endotelial. Porém as alterações microvasculares, como vasodilatação excessiva, que surgem na sepse (modelo induzido com LPS) devido a produção por tempo prolongado de NO pela iNOS não sofreram alteração com o tratamento de iNO. Esse estudo concluiu que o iNO pode apresentar efeito terapêutico eficaz em leito microvascular periférico em tecidos depletados de NO.

Outro exemplo com modelos de inflamação sistêmica é o estudo de NG et al. (2004) que verificaram o efeito do NO inalatório sobre a vasculatura periférica após a isquemia e reperfusão de mesentério de ratos, e mostraram que o tratamento reverte a diminuição do fluxo sanguíneo observado nesse modelo inflamatório, além de proporem o NO inalatório como intervenção terapêutica alternativa para danos periféricos causados pela isquemia e reperfusão.

Papadimos (2008) também observou efeitos benéficos da terapia com o NO inalatório em pacientes com SARA após traumatismo crânio encefálico, concluindo que esse tratamento pode diminuir a mortalidade, a morbidade, bem como a diminuição dos custos hospitalares e de reabilitação pelo governo. Chegaram a

essa conclusão, pois a terapia com NO inalatório diminuiu os marcadores bioquímicos da inflamação e da lesão encefálica, melhorou os parâmetros fisiológicos, bem como a pressão intracraniana e consequentemente a oxigenação no encéfalo.

1.3 O Óxido Nítrico e a Inflamação

Embora possa parecer paradoxal, o óxido nítrico parece apresentar propriedades anti-inflamatórias em determinadas situações. A magnitude e a cinética da produção de óxido nítrico são de grande importância na determinação da sua forma de participação na resposta inflamatória (FERNANDES et al., 2002). Uma certa variedade de aspectos desta participação tem sido firmemente estabelecidos: a) diversos mediadores e citocinas liberados na resposta inflamatória podem induzir a expressão da isoforma induzível da enzima NO-sintase (iNOS) (MONCADA et al., 1991); b) a fase de indução requer um período de algumas horas para se completar; c) uma vez estimulada, a iNOS é capaz de produzir grandes quantidades de óxido nítrico após algumas horas. Por outro lado, alguns mediadores produzidos precocemente no processo inflamatório podem estimular diretamente a enzima NO-sintase constitutiva endotelial, que produz pequenas quantidades de óxido nítrico, mas estas são bastante relevantes para o controle local de eventos da microcirculação (FERNANDES et al., 2002; APPLETON et al., 1996; KUBES e GRANGER, 1992).

Na verdade, o papel do óxido nítrico no processo inflamatório é ainda bastante controverso. Ialenti et al. (1992) sugeriram que o óxido nítrico endógeno é liberado no sítio inflamatório, sendo capaz de modular a formação do edema. Segundo Sautebin et al. (1995), o óxido nítrico parece estar envolvido na inflamação aguda, uma vez que a adição de L-arginina potencializou o edema, enquanto os inibidores da síntese do óxido nítrico foram capazes de reduzir o edema. Ainda em 1998, Sautebin et al., repetiram os resultados observados em 1995, agora no modelo de pleurisia induzido por carragenina. Estes autores observaram que a inibição da NO-sintase com L-NAME ou a hemoglobina foi capaz de inibir a migração de leucócitos, e que este mecanismo parece estar associado a produção de prostaglandinas. Neste modelo, a interação entre a via da ciclooxygenase e do

óxido nítrico pode representar um importante mecanismo de modulação da resposta inflamatória.

Em 1996, Salvemini et al. observaram que inibidores da síntese de NO eram capazes de inibir o edema de pata induzido por carragenina, e ainda, a presença de marcação imunorreativa para nitrotirosina, um marcador da formação de peroxinitrito.

Utilizando um modelo de ratos sensibilizados ativamente com ovalbumina, Ferreira et al. (1998) demonstraram que a inibição da síntese de óxido nítrico com L-NAME foi capaz de reduzir significativamente o acúmulo de eosinófilos, mas não de neutrófilos, no lavado broncoalveolar após desafio com ovalbumina.

Por outro lado, Fernandes et al (2002) demonstraram claramente que doadores de NO (Nitroprussiato de sódio e S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) tem um efeito anti-inflamatório no edema de pata induzido por carragenina, reduzindo o edema, a atividade da enzima mieloperoxidase (marcadora da presença de neutrófilos) e o extravazamento de proteínas. Diversos autores também reportaram o possível papel do óxido nítrico no edema inflamatório através da utilização de inibidores da síntese deste composto, como L-NAME e outros (KUBES e GRANGER, 1992; IALENTI et al., 1992; KUBES et al., 1993; GIRALDELO et al., 1994; SALVEMINI et al., 1996 a, b). Entretanto, os resultados são controversos, principalmente devido aos efeitos vasculares deste inibidores.

O acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório resulta da interação entre leucócitos e células endoteliais (KUBES et al., 1991; GRANGER e KUBES, 1994). Tem sido demonstrado que o óxido nítrico endógeno inibe a adesão leucocitária (KUBES et al., 1991; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; GUIDOT et al., 1996; LEFER e LEFER, 1996; HICKEY e KUBES, 1997; HICKEY et al., 1997; KOSONEN et al., 2000; HICKEY, 2001; LELAMALI et al., 2001; DAL SECCO et al., 2003).

Existe ainda uma controvérsia na literatura, se o óxido nítrico liberado durante o processo inflamatório tem efeito pró-inflamatório ou inibitório sobre a migração de neutrófilos. Dal Secco et al. (2003) demonstraram que durante a inflamação, o óxido nítrico liberado por ambas NO-sintases constitutiva e induzida inibem a migração de neutrófilos. Este efeito do óxido nítrico parece ser uma

consequência da diminuição da adesão e do rolamento de neutrófilos sobre o endotélio.

O estudo de Farsky et al. (2004) apresenta como resultados diminuição do número de *rolling* e aderência leucocitária em vênulas e alteração na expressão de L-selectina tanto em leucócitos circulantes quanto na medula óssea após tratamento prolongado com L-NAME e discutem que essas diferenças obtidas entre os diferentes estudos que abordam esse tema podem ser dependentes da quantidade de NO produzido, do local de produção e da presença de outras espécies e que isso caracterizaria o NO como agente protetor ou indutor de lesão em condições fisiológicas e patológicas.

1.4 O Óxido Nítrico Inalatório e a Reação Inflamatória

Embora a analogia do óxido nítrico (NO) ao fator de relaxamento derivado do endotélio permaneça controversa, a utilização médica do óxido nítrico exógeno na forma de gás para inalação tem crescido exponencialmente. Atualmente, sua utilização na hipertensão pulmonar, hipoxemia, lesão de isquemia-reperfusão, inflamação e edema tem sido reportada (TRONCY et al., 1997). Scherrer et al. (1996) reportou que a inalação de óxido nítrico diminuiu a pressão da artéria pulmonar em sujeitos com edema pulmonar devido a grandes altitudes. Inder et al. (1998) também reportaram efeitos semelhantes, e além disso, que a combinação do NO com oxigênio teve efeitos aditivos sobre a vasculatura pulmonar. Em 1997, Brett et al., utilizaram a terapia com óxido nítrico inalatório em 26 pacientes com quadro de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS) por diversas etiologias. No entanto, 14 pacientes apresentaram melhora, incluindo inibição da migração de neutrófilos, enquanto 12 pacientes não demonstraram benefícios com a terapia. Estes autores sugerem que a terapia com o óxido nítrico inalado pode ter eficácia, dependendo da fisiopatologia de sub-grupos de pacientes.

Em 2003, Paoloni et al, demonstraram em estudo clínico envolvendo 86 pacientes com tendinose crônica de cotovelo, que a aplicação tópica do doador de óxido nítrico Gliceril Trinitrato, através de adesivo transdérmico, foi capaz de reduzir significativamente a dor local, a limitação do movimento e aumentar a força dos pacientes. Em seis meses de tratamento, foi constatado desaparecimento completo

dos sintomas e queixas. Os autores sugerem que o óxido nítrico foi capaz de estimular a síntese de colágeno nos fibroblastos.

Recentemente, demonstramos que a terapia com óxido nítrico inalatório foi efetiva em reduzir significativamente o processo inflamatório nos modelos animais de edema de pata e pleurisia induzidas por carragenina em camundongos (COELHO et al., 2004; LEONARDO et al., 2004).

1.5 A Reação Inflamatória

A reação inflamatória representa um conjunto de reações locais e gerais do organismo contra uma agressão. Ela é composta de uma série de fenômenos complexos que se associam e se complementam uns aos outros formando uma reação em cascata. A resposta inflamatória visa, em última instância, combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Em 1794, o cirurgião John Hunter escreveu que “a inflamação por si própria não deve ser considerada como uma doença, mas uma operação salutar, conseqüente a uma violência ou alguma doença” (MAJNO, 1975). Este pensamento crucial enfatiza que o resultado principal do processo inflamatório agudo é a bem sucedida resolução e reparo do dano tecidual, mais do que a persistência da inflamação, que normalmente pode levar a formação de quelóides, tecido de granulação e perda de função (SERHAN e SAVILL, 2005).

Quando um tecido sofre uma lesão, ocorre uma reação local que pode ser denominada de inflamação. Primeiramente, duas teorias foram postuladas, no sentido de caracterizar a reação inflamatória: a) Teoria Humoral – a resposta inicial partiria do sangue e dos fluidos tissulares, que contém sistemas enzimáticos complexos, responsáveis por diversos eventos relacionados a reação inflamatória; b) Teoria Celular – Alternativa a Teoria Humoral - postulada por Metchnikoff, afirmava que as células brancas que apareciam durante a Reação Inflamatória eram as responsáveis pela proteção do organismos contra infecções.

O fato da reação inflamatória ser produzida por diferentes irritantes e manter características uniformes, levou a sugestão de que os sintomas fossem causados

por mensageiros químicos gerados no local da reação, e que são agora conhecidos como mediadores químicos da inflamação (KUMAR et al., 1994).

A reação que ocorre durante as primeiras horas após a lesão é independente da natureza do agente nocivo, sendo a resposta bastante similar, mesmo após uma grande variedade de estímulos. As principais mudanças observadas envolvem basicamente 03 processos:

- 1) Mudança de calibre e fluxo na microcirculação, que leva a uma vasodilatação arteriolar.
- 2) Aumento da permeabilidade vascular, que leva a formação de exudato rico em proteínas e edema local.
- 3) Migração de leucócitos do sangue circulante para o local da lesão. Estes leucócitos têm função decisiva no combate ao estímulo lesivo, não somente devido a sua função fagocitária, como também pela produção e liberação de mediadores químicos.

Há algum tempo já se sabe que o sistema nervoso e fatores endócrinos também interferem agudamente na reação inflamatória (VALLE et al., 1985; FOREMAN, 1987).

A resposta inflamatória parece ser, na verdade, parcialmente mediada por componentes (sistemas enzimáticos) presentes nos fluidos corporais como: Sistema de coagulação; Sistema fibrinolítico; Sistema caliceína-cininas; Sistema complemento (LEWIS, 1986).

1.6 Mediadores Químicos do Processo Inflamatório

1.6.1 Aminas Vasoativas

As duas aminas, histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina) são especialmente importantes porque estão disponíveis em reservas pré-formadas e estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação.

A Histamina é amplamente distribuída nos tecidos, sendo a fonte mais rica as células denominadas mastócitos, que estão normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sangüíneos. Também é encontrada em basófilos e plaquetas. A histamina pré-formada está presente nos grânulos dos mastócitos e é liberada por degranulação destas células em resposta a uma variedade de

estímulos: 1) lesão física como traumatismos, frio ou calor; 2) reações imunes envolvendo anticorpos; 3) fragmentos do complemento denominados anafilotoxinas; 4) proteínas de liberação da histamina derivadas de leucócitos; 5) neuropeptídeos; 6) citocinas (interleucina 1 e 8) (KUMAR et al., 1994).

No ser humano, a histamina causa dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade vascular das vênulas. É considerada o principal mediador da fase imediata de aumento de permeabilidade vascular, produzindo lacunas venulares. Na verdade, o aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos no sítio inflamatório é condição primordial para permitir a subsequente migração de células de defesa (leucócitos) para o local da inflamação. No entanto, este processo permite não somente a transmigração de células inflamatórias de dentro dos vasos sangüíneos para o tecido, como também o extravasamento de proteínas plasmáticas, essencialmente albumina. Por sua vez, o extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido induz um aumento da pressão osmótica em direção ao tecido, forçando também o extravasamento de líquido, acarretando o edema inflamatório.

Após estabelecido o edema inflamatório, o sistema linfático deverá se encarregar da drenagem do conteúdo extravasado, fazendo com que as condições normais sejam restabelecidas ao final do processo inflamatório.

A serotonina é um segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina. Está presente em plaquetas e células enterocromafins, e nos mastócitos de roedores. A liberação de serotonina de plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, ADP e complexos antígeno-anticorpo. A agregação e liberação plaquetárias também são estimuladas pelo Fator de Ativação Plaquetária (PAF), proveniente dos mastócitos durante reações mediadas por imunoglobulinas. Deste modo, a reação de liberação plaquetária resulta em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (KUMAR et al., 1994).

1.6.2 Sistema de Cininas

As cininas, representadas pela bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina, são peptídeos vasoativos potentes liberados a partir de substratos proteicos, denominados cininogênios, pela ação de certas proteases, conhecidas

genericamente como cininogenases (ANTUNES, 2001). A bradicinina é um potente agente que aumenta a permeabilidade vascular. A bradicinina também causa contração do músculo liso, dilatação dos vasos sanguíneos e dor, quando injetada na pele (ANTUNES, 2001).

1.6.3 Metabólitos do Ácido Araquidônico (AA): Prostaglandinas e Leucotrienos

Quando as células são ativadas por diferentes estímulos, os lipídeos das suas membranas são rapidamente remodelados para gerar mediadores lipídicos biologicamente ativos que servem como sinais intracelulares ou extracelulares. Os produtos do AA influenciam uma variedade de processos biológicos, incluindo inflamação e hemostasia. São mais bem vistos como autacóides (ou ainda eicosanóides), ou hormônios locais de curto alcance, os quais se formam rapidamente, exercem seus efeitos localmente e, então, decompõem-se espontaneamente ou são destruídos de maneira enzimática.

Os eicosanóides são sintetizados por duas classes principais de enzimas: a) ciclooxigenase, originando prostaglandinas e tromboxano; b) lipooxigenase, originando leucotrienos. Os eicosanóides podem mediar praticamente todas as etapas da inflamação. São encontrados em exsudatos inflamatórios, e sua síntese é aumentada em locais de inflamação. Agentes estruturalmente distintos que podem suprimir a atividade da enzima ciclooxigenase (aspirina, nimesulida, indometacina, meloxicam, piroxicam, denominados antiinflamatórios não esteroidais) são capazes de inibir o processo inflamatório in vivo. (RYAN e MAJNO, 1977; BAKHLE e BOTTING, 1996)

A via da enzima ciclooxigenase leva à geração de prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGG e PGH etc.). Como as prostaglandinas desempenham um importante papel no processo inflamatório, uma interferência em sua síntese determina uma sensível redução nas alterações proporcionadas pela inflamação (VANE et al, 1998), visto que a inibição da síntese de prostaglandinas é o mecanismo de ação de muitos antiinflamatórios não-hormonais.

O estudo da reação inflamatória e o desenvolvimento de novas drogas ou terapias sempre dependeu da existência de modelos animais apropriados. Apesar da maioria das doenças inflamatórias severas apresentarem natureza crônica, os

modelos de inflamação aguda são importantes e necessários (SEDGWICK e LEES, 1986).

1.7 Vasos Linfáticos na Inflamação

O sistema de vasos linfáticos e linfonodos filtra e policia os líquidos extravasculares. Juntamente com o sistema de fagócitos mononucleares, representa uma segunda linha de defesa que entra em ação sempre que uma reação inflamatória local não consegue conter e neutralizar uma lesão (BENOIT et al., 1989; ZAWIEJA, 1996).

Os vasos linfáticos são canais extremamente delicados e difíceis de serem visualizados em seções teciduais comuns porque se colapsam prontamente. São revestidos por endotélio delgado e contínuo com junções celulares frouxas e superpostas; membrana basal escassa; e ausência de sustentação muscular, exceto nos ductos maiores. O Fluxo linfático na inflamação é aumentado, e parece ser o grande responsável pela drenagem do líquido do edema do espaço extravascular. Não apenas líquido mas também leucócitos e restos celulares chegam à linfa. Válvulas estão presentes nos vasos linfáticos, permitindo que o conteúdo linfático flua apenas no sentido proximal à lesão (BENOIT et al., 1989; ZAWIEJA, 1996).

1.8 O Uso da Carragenina como Agente Flogógeno

Durante a década de 60, a carragenina passou a ser muito utilizada experimentalmente, principalmente por sua habilidade em induzir uma reação inflamatória aguda (DI ROSA, 1972). Apesar da falta de conhecimento da patogenia desta reação, centenas de compostos anti-inflamatórios foram desenvolvidos baseados neste ensaio.

A principal fonte de carragenina é a alga *Chondrus crispus*, também conhecida como Irish Moss, e ocorre em Carragheen (Waterford, Irlanda), onde cresce abundantemente. Posteriormente, material de composição semelhante e propriedades similares foi isolado de outras algas incluindo *Gigartina stellata*, *Rhodymenia palmata* e outras.

A carragenina extraída da *Chondrus crispus* é um polissacarídeo sulfatado que pode ser separado em 2 compostos. Uma fração transforma-se em gel sob a ação do íon potássio e é designada como K, e a outra que é insensível ao potássio foi chamada de lambda. As frações k e lambda representam respectivamente 40 e 60% do extrato não fracionado (DI ROSA, 1972).

O uso da carragenina como irritante para induzir a formação de edema na pata de rato foi introduzida por Winter et al. (1962). Logo em seguida o efeito da indometacina foi ensaiado utilizando este procedimento, o qual com pequenas modificações tornou-se um dos métodos mais populares como teste para, avaliação de drogas e terapias anti-inflamatórias. Classicamente, a primeira fase (1-2 h) do edema de pata induzido por carragenina é caracterizado pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto que a segunda fase (2 - 4 h) tem sido correlacionada com a elevada produção de prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971). A infiltração local de neutrófilos também contribui para a resposta inflamatória neste modelo (DI ROSA e SORRENTINO, 1968; VINEGAR et al., 1971)

Embora menos explorado que o edema de pata em ratos, o edema de pata induzido em camundongos tem sido demonstrado como um modelo importante e útil para o estudo do processo inflamatório (HENRIQUES et al., 1987). Essencialmente, os mesmos mediadores inflamatórios estão envolvidos no modelo em camundongos, e o modelo permite perfis similares para várias drogas anti-inflamatórias (CAMPOS et al., 1999; UENO et al., 2000;)

O NO é uma das substâncias endógenas que tem sido descrito como um mediador que pode inibir a resposta inflamatória (TSAO et al., 1997)

1.9 Eventos Vasculares e Formação de Edema

O endotélio controla o tônus vascular a partir de músculos lisos vasculares pela liberação de várias substâncias vasoativas, incluindo o NO, espécies reativas de oxigênio (EROs), íons de potássio (K^+) e metabólitos do ácido araquidônico, mediadores lipídicos, gerados pela ação da enzima ciclooxygenase, como algumas prostaglandinas (PGs: PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$) e pela ação da enzima lipooxygenase, como os leucotrienos (LTB_4 ;) (LAWRENCE et al., 2002).

Esses fatores ativam diferentes famílias de canais de K^+ e a hiperpolarização do músculo liso vascular contribui para o mecanismo que conduz ao relaxamento

vascular. Além disso, outra via associada com a hiperpolarização de ambas células endoteliais e musculares lisas vasculares também contribuem com o relaxamento dependente do endotélio, conferindo o termo Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF – *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*) (FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 2009).

O endotélio se comporta como uma camada condutiva propagando sinais elétricos ao longo do vaso sanguíneo, através das *gap junctions* percorrendo toda parede vascular. Essa condução elétrica ativa canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, aumentando assim, a concentração de Ca^{2+} e consequentemente abrindo canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} . Esses canais são os canais de Ca^{2+} de pequena condutância, amplamente distribuídos pela membrana plasmática, e os canais de condutância intermediária, expressos preferencialmente nas células endoteliais em direção às células de músculo liso (SK_{Ca} – *small conductance potassium channel* e IK_{Ca} – *intermediate conductance potassium channel*, respectivamente) (FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 2009).

A vasodilatação resulta em geração de calor e rubor local, e tem como função aumentar o aporte de mediadores inflamatórios e de leucócitos circulantes no tecido inflamado. A vasodilatação ocorre inicialmente nas arteríolas. Em doenças acompanhadas de resposta inflamatória sistêmica (como a sepse, por exemplo), a vasodilatação pode envolver inúmeros leitos vasculares, levando à hipotensão e choque (LAWRENCE et al., 2002).

Um dos sinais mais precoces da inflamação na microcirculação é o aumento da permeabilidade vascular, provocada principalmente pela degranulação dos mastócitos teciduais que contém quantidades grandes de histamina, bradicinina, triptase, metabólitos do ácido araquidônico e que ativam células microvasculares (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

As células endoteliais, que recobrem a camada interior dos vasos sanguíneos, formam uma barreira semipermeável que ativamente participa de trocas de fluídos plasmáticos, proteínas e células entre sangue e tecidos, tanto por via transcelular (através da célula) quanto paracelular (entre as células), representando eventos importantes no desenvolvimento de doenças previamente mencionadas como síndrome da angústia respiratória aguda, isquemia e reperfusão, complicações vasculares do diabético e metástase tumoral (KUMAR et al., 2009).

Sob as condições fisiopatológicas da inflamação, a hiperpermeabilidade vascular é promovida por mediadores circulantes e fatores de crescimento que se ligam aos receptores endoteliais e desse modo disparam sinais nessa barreira, até então semipermeável, permitindo assim, o extravasamento plasmático e de proteínas formando o edema inflamatório, também denominado de exsudato (KUMAR et al., 2009).

Dentre estes mediadores, destacam-se a histamina, a bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, o fator de ativação plaquetária (PAF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LAWRENCE et al., 2002; KUMAR et al., 2009).

As células endoteliais são unidas por proteínas de adesão transmembranar que formam as regiões de junção. Existem as junções de oclusão (*tight junctions*) e as junções aderentes (*adherens junctions*), que impedem a passagem de proteínas do plasma (por exemplo, albumina e imunoglobulinas) para o espaço extravascular (DEJANA et al., 2009).

As junções aderentes e as junções de oclusão tem diferentes funções. As junções aderentes iniciam os contatos celulares e promovem a maturação e manutenção desses contatos. Já as junções de oclusão regulam as passagens de íons e solutos pela via paracelular, além de agir como um “cercado” limitando movimentos de lipídios e proteínas entre as superfícies celulares apical e basolateral (DEJANA et al., 2009).

Em ambos os tipos de junções a adesão é mediada por proteínas transmembranas que promovem interações homofílicas e formam uma estrutura pericelular parecida com um *zipper* ao longo da borda lateral da célula. As caderinas são as proteínas transmembranas expressas nas junções aderentes e as claudinas são expressas nas junções de oclusão. Uma variedade de proteínas transmembrana adicionais podem ser encontradas nas junções de oclusão como as JAMs, ESAM e ocludinas e contribuem para a adesão intracelular (WALLEZ e HUBER, 2008).

O estímulo edematogênico é capaz de induzir a contração das células endoteliais, permitindo a formação de espaços entre as mesmas, e, conseqüentemente o efluxo de líquido e proteínas para o tecido. A passagem de líquido e proteínas através do endotélio pode ainda ocorrer através da própria célula endotelial, mediado por poros chamados “fenestras” (estruturas dinâmicas capazes

de contrair e dilatar) ou por transporte vesicular através das cavéolas (invaginações na membrana citoplasmática que funcionam como vesículas endocíticas, que transportam macromoléculas através da célula endotelial; RYAN e MAJNO, 1977; SERHAN et al., 2008).

Alterações de pressão (hidrostática e oncótica) também auxiliam no processo de extravazamento de líquido do espaço intravascular para o tecido. O aumento de aporte sanguíneo causado pela vasodilatação leva ao aumento da pressão hidrostática no foco inflamatório. O extravazamento de líquido para o tecido leva ao aumento da viscosidade do sangue (pelo aumento da concentração de eritrócitos circulantes), mas acaba por restabelecer a pressão intravascular no foco inflamado. Ao mesmo tempo, a perda de proteínas plasmáticas reduz a pressão oncótica intravascular. Desta forma, o aumento de permeabilidade vascular, o aumento transitório da pressão hidrostática intravascular e a queda da pressão oncótica plasmática levam ao extravazamento de plasma para o interstício. Estas alterações auxiliam na distribuição de mediadores e fatores solúveis no tecido inflamado (TROWBRIDGE e EMLING, 1996).

1.10 Hipótese

Tendo em vista o exposto, definimos que a hipótese do presente trabalho é de que o óxido nítrico administrado por via inalatória possui efeito anti-inflamatório, os quais extrapolam aqueles efeitos vasculares inicialmente observados.

2 OBJETIVO

O presente trabalho visa investigar o efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatória, em outros sítios inflamatórios, diferentes do sistema respiratório, utilizando para isto, os modelos clássicos de edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Edema de Pata

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 15 e 20 g (6-8 semanas), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Os animais tiveram água e ração *ad libitum*, sendo mantidos em sala com temperatura (20 - 24^o) e umidade em torno de 60%, com ciclos claro/escuro (12/12 horas). Os procedimentos utilizados estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram submetidos à Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB – USP), número 066 nas folhas 18 do livro 2.

3.1.2 Indução do Edema de pata

O edema foi induzido em camundongos previamente anestesiados com halotano por via inalatória (COSTA et al., 2001), pela injeção intra-plantar de carragenina (CGN) na pata posterior esquerda (300 µg/pata; carragenina lambda tipo IV, Sigma Chemical Co., USA). O mesmo procedimento foi realizado com injeção de salina nas patas esquerdas de camundongos que estavam no grupo controle. O volume das patas foi mensurado através de um hidropletismógrafo (modelo 7140, Ugo Basile™, Itália) conforme demonstrado na figura 3. Previamente à administração de carragenina, foi realizada uma medição inicial (MI) dos volumes das patas esquerdas, o qual serviu como controle individual. Os valores de volume foram registrados 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina. As medições foram realizadas em triplicata e a MI foi subtraída da média dos valores obtidos em cada período. Os valores de edema assim calculados foram colocados em gráficos em função do tempo.

Figura 3: Figura ilustrativa da mensuração do edema de pata em camundongo por meio de um hidropletismógrafo.

3.1.3 Tratamento com NO inalatório

Os animais foram colocados em caixas de plástico transparente (400x270x133 mm para camundongos), especialmente adaptadas (Figura 4) em grupos de até 6 animais por caixa.

As caixas estavam providas de cânula de polietileno bifurcada (tipo Y; 3 mm diâmetro interno) para conexão das mangueiras de entrada de ar ambiente (a um fluxo de 10 L/min fornecido por aparelho de nebulização) e NO (fluxos variáveis de 300 ppm de NO em N₂; White Martins, SP), conforme mostrado na figura abaixo:

Figura 4: Sistema empregado para administração de óxido nítrico por via inalatória em roedores.

Os animais inalaram o NO (em concentrações variáveis entre 13,6 e 196,3 ppm) 30 minutos após as injeções de carragenina durante tempo variáveis de inalação (2-10 minutos). Além disso, foram realizados tratamentos com múltiplas doses de NO (a melhor concentração e o melhor tempo de inalação administrados, 1, 2 ou até 3 vezes).

Importante notificar que os grupos de animais controles tanto carragenina quanto salina receberam ar 30 minutos após as injeção de carragenina durante 10 minutos de inalação.

Além disso, outro grupo de camundongos recebeu Indometacina (5 mg/Kg i.p.). A Indometacina foi utilizada neste trabalho por sua atividade anti-inflamatória, capaz de inibir de maneira inespecífica a atividade de todas as isoformas conhecidas da enzima ciclooxigenase. Além disto, a Indometacina pode ser considerada como a droga anti-inflamatória não esteroideal mais potente para uso clínico, com indicações em doenças como osteoartrite, artrite reumatóide e espondilite anquilosante.

3.1.4 Tratamentos com inibidores de fosfodiesterases

Para elucidar as vias de sinalização envolvidas, o iNO foi co-administrado aos inibidores de fosfodiesterases. Os animais receberam injeção intraperitoneal de sildenafil (1 mg/Kg; TOWARD et al., 2004) ou rolipram (3 mg/Kg; SEKUT et al., 1995) imediatamente após a injeção intra-plantar de carragenina nas patas de camundongos. Meia hora após a injeção de carragenina, foi realizado o tratamento com NO inalatório na dose de 13,6 ppm ou indometacina (5 mg/Kg, i.p.) e com tempo de exposição de 10 minutos.

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com halotano por via inalatória e sacrificados por deslocamento cervical. As patas que receberam a injeção de carragenina foram imediatamente removidas e mantidas a -70°C para posteriores análises.

3.1.5 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase

As amostras de patas injetadas com carragenina foram pesadas e para cada 50 mg de tecido foi adicionado 1 mL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB 0,5%, Sigma Chem. Co., EUA) e homogeneizadas (homogeneizador Heidolph Diox 900, Alemanha). Os homogenatos foram aquecidos durante 2 horas a 60° C em banho-maria (para inativação da catalase endógena), transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 10000 *g* durante 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e usados como fonte para medida da atividade de MPO.

Dez microlitros de homogenato foram adicionados a 200 µL de tampão fosfato de potássio, pH 6 que continha 0,164 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). A mudança de absorbância (OD) foi medida em um leitor de ELISA (Espectra max plus 384, EUA) a 460nm durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos.

Gráficos semelhantes ao mostrado na figura 5 (variação de absorbância em função do tempo) foram obtidos. Do gráfico de OD (densidade óptica ou

absorbância) em função do tempo (em seg), escolhemos o intervalo de tempo no qual as medidas de OD aumentavam de forma linear (correspondendo ao valor de R^2 mais próximo de 1), obtendo da inclinação da reta o valor de Vmax/seg. Foi calculada a média das duplicatas e dividida pela quantidade de tecido contido em cada poço da placa (a cada 10 μ L de homogenato correspondem 0,5 mg de tecido).

Considerando-se que 1 μ mol de H_2O_2 corresponde a uma variação 0,0113 AU (unidades de absorbância), a atividade de MPO foi expressa em unidades de MPO e corrigida pela quantidade de tecido (mg) adicionada ao ensaio segundo a fórmula:

$$MPO (U/mg) = Vmax/s \times 60 / 0,0113 / 0,5$$

considerando que uma unidade de atividade MPO é definida como aquela capaz de degradar um micromol de H_2O_2 por minuto (BRADLEY et al., 1982).

Figura 5: Gráfico representativo da cinética da reação para cálculo da atividade de MPO, obtidas de homogenatos de amostras de pulmões de ratos.

3.1.6 Análise histomorfológica das patas de camundongos

As patas esquerdas (submetidas às injeções de carragenina ou salina) foram removidas após o sacrifício dos camundongos na 4^a hora. Em seguida, as patas

foram fixadas em formol a 10% por um período mínimo de 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA a 10% em PBS a 4 °C durante 20 dias.

As amostras foram então submetidas a procedimentos de rotina para inclusão em parafina para secção sagital com 5µm de espessura e método de coloração com hematoxilina e eosina. Os cortes foram desidratados e diafanizados em concentrações crescentes de álcoois e xilóis, cobertos com lamínulas e meio de montagem permanente DPX.

Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente e quantitativamente através de microscopia de luz (Nikon eclipse 800N) para avaliar o padrão e intensidade de alterações teciduais e infiltração de neutrófilos nas patas.

Sob microscopia de luz, acima descrita, em aumento de 400 vezes, contou-se o número de células, especificamente neutrófilos, presentes em 10 campos aleatórios da região sub-plantar das patas. Ao final, foi realizada a soma das células contadas nos 10 campos analisados (REIS, 2007), ou seja os resultados foram expressos em número de células totais.

3.1.7 Ensaio de expressão proteica

3.1.7.1 *Western Blotting*

A nitração de proteínas é considerada um marcador dos níveis de estresse oxidativo tecidual, o que pode indicar toxicidade do tratamento com NO inalatório. Deve-se ressaltar, que uma das principais preocupações da utilização clínica deste tratamento é o possível aumento da expressão de proteínas nitradas no tecido, tendo em vista que a formação de peroxinitritos ou peroxidases durante o processo inflamatório é um conhecido indutor de apoptose entre outras coisas.

A expressão de proteínas nitradas em resíduos de tirosina (nitrotirosina) foram estudadas pela técnica de *western blotting*. Resumidamente, 25 µg de proteínas presentes nas amostras de homogenatos e patas (preparado empregando para cada grama de tecido 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo 10 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de inibidor de tripsina, 2 µg/mL de aprotinina e 1 mM de PMSF) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida à 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) conforme originalmente descrito por Laemmli (1970). Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas

eletroforeticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (150 mA, 2 horas). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína 0,2% preparada em tampão TBS-t (TRIS 20 mM + NaCl 137 mM contendo 0,1% de Tween 20). A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos anti-3-nitrotirosina (monoclonal feito em camundongo, 500 ng/mL). Após essa etapa foi feita a lavagem com TBS-t (6x10 minutos); as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo feito em cabra, conjugado com fosfatase alcalina, 1:3000), submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t, e as bandas imunorreativas foram detectadas através de kit de quimioluminescência (Bio Rad, EUA). As imagens foram captadas mediante sistema Chemilmager (Alpha Innotech, EUA), digitalizadas e as intensidades (como medida do grau de expressão da proteína) foram determinadas por análise densitométrica.

O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (PM, faixa de 7 a 205 kDa; Bio Rad, EUA).

A Tabela 1 indica a quantidade de proteína administrada, porcentagem de acrilamida presente no gel, assim como, concentração e especificação do anticorpo utilizado para a proteína estudada.

Tabela 1 – Características dos componentes para *western blotting*.

Proteína	Gel	Amostra (µg/lane)	Anticorpo primário	Anticorpo secundário + conjugado
3-NT	10%	25 µg	Anti-NT (monoclonal de camundongo, Upstade, EUA) 1:2000 (500 ng/ml)	Policlonal de cabra anti-camundongo+AP (1:3000)

3.2 Pleurisia

Com o objetivo de investigarmos se o efeito anti-inflamatório do óxido nítrico inalatório é restrito ao modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina, realizamos também o modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.

A reação inflamatória induzida no espaço pleural (espaço virtual entre a pleura parietal e a pleura visceral), conhecida como pleurisia, é um modelo clássico de estudo do processo inflamatório, assim como, para o teste de possíveis drogas anti-inflamatórias. Neste modelo, o volume do fluido extravasado, o acúmulo celular e a produção de mediadores químicos que participam do processo inflamatório, podem ser quantitativamente e qualitativamente analisados. Deve-se ressaltar que trata-se de um modelo onde avalia-se o acúmulo de células inflamatórias que migraram para a cavidade torácica e a análise do exsudato inflamatório produzido. O modelo de pleurisia foi originalmente descrito em ratos e mais tarde adaptado para cobaias. Esta técnica foi aperfeiçoada e adaptada para camundongos, por Henriques et al (1990).

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb C do sexo masculino, pesando entre 20 e 25g (6-8 semanas), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Os animais tiveram água e ração *ad libitum*, sendo mantidos em sala com temperatura (20 - 24º) e umidade em torno de 60%, com ciclos claro/escuro (12/12 horas).

3.2.2 Indução da Pleurisia

A inflamação foi induzida através de injeção intratorácica contendo 100 µl do indutor carragenina 0,1mg/cavidade. A injeção foi realizada do lado direito da caixa torácica, com agulhas 10 x 5 adaptadas, medindo aproximadamente 3mm de comprimento, em camundongos sob leve anestesia com halotano. Os animais utilizados como controle receberam igual volume de solução salina estéril. Os animais foram sacrificados em câmara fechada pela inalação de CO₂, e em seguida suas cavidades torácicas foram abertas e lavadas com 1ml de solução tampão (água MilQ + PBS). O volume do interior da cavidade foi recolhido com pipeta automática.

3.2.3 Contagem de Células Inflamatórias

Para a contagem do número total de leucócitos presentes no lavado pleural, 10 µl do lavado foram diluídos na proporção de 1:40 em solução Turk. A contagem foi realizada utilizando câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico Karl Zeiss sob aumento de 100 vezes. Os resultados foram expressos como número total de leucócitos por cavidade.

3.2.4 Contagem Diferencial de Leucócitos

Para a contagem diferencial de leucócitos, alíquotas de 150 µl da suspensão celular foram utilizadas para preparo do cito-esfregaço em citocentrífuga (FANEM Citospin). A coloração foi realizada como descrito pelo fabricante do Kit de corante Instant Prov III (soluções de ciclohexadienos, azobenzenosulfônicos e fenotiazinas), e a contagem diferencial das células realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo, com aumento de 1.000 vezes. As populações celulares avaliadas foram de células mononucleares e neutrófilos.

3.3 Análise Estatística:

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) para valores absolutos ou porcentagem de n animais/amostras. Diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste de ANOVA de 1 via, seguido do teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. Na análise paramétrica de dois grupos experimentais foi aplicado o teste t não pareado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito de diferentes doses de NO inalatório no edema de pata induzido por carragenina em camundongos

A injeção intraplantar de carragenina nas patas esquerdas dos camundongos causou significativo edema até a 4^a hora estudada. Já o grupo controle, animais que receberam salina nas patas, não desenvolveu edema significativo.

Conforme mostrado na figura 6, diferentes doses de NO inalatório foram testadas, mas somente as doses mais baixas (13,6 e 41,6 ppm) mostraram significativo efeito na redução do edema de pata, de forma similar ao efeito anti-inflamatório da indometacina quando comparados com o grupo carragenina + ar.

Dessa forma ficou estabelecida a dose ótima de NO inalatório (13,6 ppm) a ser aplicada nos próximos protocolos experimentais.

Figura 6: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1^a – 4^a hora), e tratamento ora com NO inalatório em diferentes doses ou Ar, durante 10 minutos de inalação, ora com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n = 8; *P<0,05 vs CGN +Ar.

4.2 Detecção por *Western blotting* de proteínas nitradas em resíduos de tirosina em patas de camundongos coletadas 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina. Efeito do tratamento com diferentes doses de NO inalatório

Como a presença de peroxinitrito é um indicativo de toxicidade, foi realizado *Western Blotting* de proteínas nitradas em resíduos de tirosina com intuito de avaliar a participação do iNO e espécies derivadas do NO (ONOO^-) no modelo inflamatório empregado.

Na figura 7, a análise qualitativa do *western blotting* para expressão de proteínas nitradas em resíduos de tirosina em patas de camundongos que receberam injeção intraplantar de carragenina demonstra que o NO aumenta a nitração de forma dependente da dose, evidenciado pela banda (51 KDa) de menor densidade referente a menor dose de NO inalatório (13,6 ppm). Também foi observado que o NO inalatório quando administrado no grupo que recebeu a injeção de salina nas patas apresentou densidade diminuída da banda do mesmo peso molecular, indicando menor nitração.

Figura 7: *Western blotting* representativo de resíduos proteicos de nitrotirosina presentes em camundongos coletadas 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina ou solução salina e tratamento com NO inalatório em diferentes concentrações. +: NTBSA: albumina de soro bovino nitrada *in vitro* (controle positivo).

4.3 Determinação do melhor tempo de inalação

Nesse gráfico (Figura 8) pode ser observado que a carragenina é um potente agente flogístico, conforme a descrição de Winter e colaboradores (1962), e promoveu edema evidente até a 4^a hora. Salina não foi capaz de disparar nenhuma resposta inflamatória e a indometacina (5 mg/Kg), via i.p., reduziu o edema de pata significativamente a partir da 2^a hora.

Como a dose mais baixa do NO inalatório (13,6 ppm) foi eficaz na redução do edema de pata, foram testados tempos menores de inalação com intuito de verificar efeitos de NO inalatório em concentrações menores, adquiridas com menores tempo de inalação.

No entanto, somente o tempo de 10 minutos de inalação mostrou significativo efeito anti-inflamatório quando comparado com 5 ou 2 minutos de inalação.

Figura 8: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1^a – 4^a hora), e tratamento com NO inalatório na doses de 13,6 ppm, durante tempos variáveis de inalação (2, 5 ou 10 min) ou Ar, durante 10 minutos de inalação, e com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n = 6; *P<0,05, **P<0.01 e ***P<0,001 vs CGN +Ar.

4.4 Efeito do tratamento com diferentes tempos de exposição ao NO inalatório na nitração de proteínas

Na figura 9, observa-se que a injeção de carragenina resulta em aumento da quantidade de proteínas nitradas em tirosina detectadas nas patas 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina quando comparado com os animais do grupo salina.

Ainda, análise revelou diminuição da nitração de algumas proteínas de pesos moleculares variáveis (~130 kDa e ~50 kDa) comparado ao grupo carragenina, porém a nitração observada nesse grupo apresentou-se maior em relação ao grupo salina e carragenina + indometacina.

Figura 9: *Western blotting* representativo para expressão proteica de nitrotirosina em patas esquerdas de camundongos retiradas ao final do experimento, na 4ª hora. Efeito do tratamento com NO inalatório na concentração de 13,6 ppm em diferentes tempos de inalação.

4.5 Determinação da posologia do NO inalatório

Depois de determinada a dose e o tempo ótimos de inalação (13,6 ppm durante 10 min de inalação), múltiplas administrações de NO inalatório foram testadas nessas condições

Figura 10, mostra que todos os 3 grupos de tratamentos com NO inalatório, sejam eles com 1, 2 ou 3 administrações, além do grupo tratado com indometacina foram capazes de reduzir o edema de pata a partir da 2ª hora, porém somente a indometacina manteve tal efeito até a 12ª hora.

Figura 10: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1^a – 12^a hora), e tratamento com NO inalatório na doses de 13,6 ppm ou Ar, durante 10 minutos de inalação, em múltiplas administrações (30 min, 4 hs ½ e 8 hs ½), e com indometacina (Indo; 5 mg/Kg, i.p.), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n = 6; **P<0.01 e **P<0,001 vs CGN +Ar.

4.6 Efeito dos tratamentos concomitantes entre o NO inalatório e o inibidor de fosfodiesterase V, sildenafil

Figura 11 mostra que o tratamento com NO inalatório tanto quanto com o sildenafil sozinhos ou com administrações concomitantes de ambos os tratamentos reduziram de forma significante o edema de pata causado por carragenina. Porém é interessante notar que existe uma diferença significante entre os grupos.

O efeito anti-edematogênico do sildenafil administrado sozinho parece ser mais potente do que o efeito produzido pelo NO inalatório. NO entanto, houve uma potencialização dos efeitos com a administração concomitante de ambos os

tratamentos reduzindo o edema de pata de forma mais predominante quando comparado com as administrações de NO inalatório ou sildenafil sozinhos.

Figura 11: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1^a – 4^a hora), e tratamento com NO inalatório na doses de 13,6 ppm ou Ar, durante 10 minutos de inalação, em única administração; tratamento com indometacina (Indo; 5 mg/Kg, i.p), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos, e tratamento com sildenafil (1 mg/Kg; i.p.) injetado imediatamente após a injeção de CGN e associação entre iNO e sildenafil. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n=5 * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 vs CGN + ar; # P<0,05 e ## P<0,01 vs CGN + NO; ++ P<0,01 vs CGN + sildenafil.

4.7 Efeito dos tratamentos concomitantes entre o NO inalatório e o inibidor de fosfodiesterase IV, rolipram

O gráfico (Figura 12) mostra o mesmo padrão de resposta do gráfico mencionado anteriormente. A injeção intraplantar de carragenina causou significativa resposta inflamatória e a salina não causou nenhuma modificação significativa no volume inicial da pata.

O iNO, bem como o rolipram sozinhos apresentaram-se capazes de reduzir o edema de pata de forma significativa, porém o rolipram apresentou efeito anti-edematogênico mais eficaz do que o NO inalatório.

Porém, nesse gráfico, não pode ser observado um efeito potencializador com a administração concomitante entre ambos os tratamentos (iNO + rolipram), diferente do apresentado anteriormente, tratamento concomitante com a administração de sildenafil, um inibidor de fosfodiesterase V que aumenta os níveis de GMPc.

Figura 12: Evolução temporal do edema representado pela diferença entre os aumentos de volumes (Δ) das patas, em diferentes intervalos de tempo (1^a – 4^a hora), tratamento com NO inalatório na doses de 13,6 ppm ou Ar, durante 10 minutos de inalação, em única administração; tratamento com indometacina (Indo; 5 mg/Kg, i.p.), 30 min depois da injeção de carragenina (CGN; 300 μ g) nas patas posteriores esquerdas dos camundongos, e tratamento com rolipram (3 mg/Kg; i.p.) injetado imediatamente após a injeção de CGN e associação entre iNO e rolipram. Os dados foram expressos em médias $\pm$ EPM, n=5 * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 vs CGN + ar; # P<0,05, ## P<0,01 e ### P < 0,001 vs CGN + NO.

4.8 Efeito do NO inalatório no acúmulo neutrofílico no edema de pata em camundongos

A Figura 13, painel A, mostra que a carragenina causou significativo aumento na atividade de MPO, um indicador de acúmulo de células polimorfonucleadas, nesse caso neutrófilos, diferente do observado com a injeção de salina.

Além disso, o NO inalatório, bem como a indometacina, reduziram significativamente a migração celular para o sítio de inflamação observado 4 horas após a injeção de carragenina.

Considerando que a atividade de MPO é uma medida indireta para quantificar neutrófilos no local da inflamação, lâminas de histologia das patas dos camundongos foram produzidas para permitir a confirmação da presença dessas células e para verificar a organização dos tecidos dentro das patas de camundongos dos diferentes grupos.

Na figura 13 painel B, confirma o resultado apresentado no painel A. O NO inalatório e a indometacina conseguiram diminuir a migração de neutrófilos nas patas inflamadas quando comparado com as patas dos camundongos do grupo carragenina.

A.

B.

Figura 13: Efeito do NO inalatório (13,6 ppm) ou Ar, durante 10 minutos de inalação ou Indometacina (Indo; 5 mg/Kg) na migração de neutrófilos nas patas. **Painel A:** Atividade de MPO presente em patas de camundongos após 4 horas da indução do edema por carragenina (CGN; 300 µg) e tratamentos com NO/Ar ou Indometacina. **Painel B:** Contagem de neutrófilos em amostras histológicas de patas de camundongos submetidos a indução do edema de pata por carragenina CGN; 300 µg) e tratamentos com NO/Ar ou Indometacina. Os dados foram expressos como média ± EPM para um n=6/grupo. * P<0,05, ** P<0,01*** e P<0,001 vs CGN + Ar.

4.9 Fotomicrografia de lâminas histológicas de patas de camundongos depois da inoculação com carragenina ou salina

Lâminas histológicas foram confeccionadas para ilustrar as condições *in situ* das patas posteriores dos camundongos nos diferentes grupos.

Na primeira fotomicrografia (Figura 14, painel A) pode ser observada a organização da região subplantar depois da injeção de salina. Um feixe de fibras musculares pode ser observado na margem superior e um epimísio distinto o separa do tecido conectivo.

O tecido conectivo não mostra evidências de sinais de inflamação com escassez de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, ausência de edema e hemorragia.

O painel B mostra uma intensa presença de células polimorfonucleadas, especificamente neutrófilos, no infiltrado inflamatório e edema caracterizado por amplos espaços irregulares no tecido conectivo da matriz extracelular do grupo carragenina.

O grupo tratado com NO inalatório (painel C) apresentou redução na infiltração de células inflamatórias e edema quando comparado com o grupo carragenina. A redução do infiltrado celular foi menor do que no grupo tratado com indometacina. Além disso, a redução do edema pareceu ser mais evidente nesse grupo quando comparado com o grupo tratado com indometacina, mas essa evidência não foi quantificada.

O grupo tratado com indometacina (painel D) apresentou uma diminuição na migração de neutrófilos, discreta redução do edema quando comparada com o grupo carragenina.

Figura 14: Fotomicrografia das lamina histológicas das patas dos camundongos, coradas por H&E, 4 horas depois do edema de pata induzido por carragenina. **Painel A:** Inoculação de salina na pata posterior de camundongo e tratamento com Ar (10 minutos de inalação), 30 min depois da injeção de salina. **Painel B:** Inoculação de carragenina (CGN; 300 µg) na pata posterior de camundongo e tratamento com Ar (10 minutos de inalação), 30 min depois da injeção de CGN. **Painel C:** Inoculação de carragenina (CGN; 300 µg) na pata posterior de camundongo e tratamento com NO inalatório (13, 6 ppm, durante 10 minutos de inalação, única dose), 30 min depois da injeção de CGN. **Painel D:** Inoculação de carragenina CGN; 300 µg) na pata posterior de camundongo e tratamento com indometacina (Indo; 5 mg/Kg), 30 min depois da injeção de CGN.

4.10 Efeito do NO inalatório no acúmulo de leucócitos total no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos

A injeção intrapleurar de carragenina causou significante acúmulo de leucócitos até a 4ª hora estudada. Já o grupo controle, animais que receberam salina pela injeção intrapleurar, não foi observado acúmulo significativo das mesmas células.

Conforme mostrado na figura 15 A, diferentes doses de NO inalatório foram testadas, e nesse modelo, diferente do edema de pata, todas as doses (13,6; 41,6 e 196,3 ppm) mostraram efeito significativo na redução do acúmulo total de leucócitos.

Como o NO pode apresentar efeitos tóxicos, ficou estabelecida que a dose ótima a ser aplicada nos próximos protocolos experimentais seria a de 13,6 ppm.

O painel B da Figura 15, mostra o efeito do NO na dose de 13,6 ppm, porém com tempos de inalação variados sobre o acúmulo total de leucócitos. Nesse gráfico observa-se que o NO apresentou efeito redutor do acúmulo de leucócitos totais quando a dose escolhida foi administrada por tempos menores de inalação, como 5 e 15 minutos. O mesmo efeito não ocorreu, quando o tempo de inalação, mesmo com a dose mais baixa, foi de 30 minutos.

A. **B.**

Figura 15: Contagem de leucócitos totais em lavado bronco alveolar após administração de carragenina pela injeção intrapleural. **Painel A:** Efeito do NO inalatório, administrado em diferentes doses, sobre o acúmulo total de leucócitos. **Painel B:** Efeito do NO, na dose de 13,6 ppm, administrada em tempos diferentes de inalação, sobre o acúmulo total de leucócitos.

4.11 Efeito do NO inalatório no acúmulo de células mononucleares no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos

A Figura 16, gráficos A e B mostram que após a injeção de salina, controle negativo, há a presença de células mononucleares e que a administração de carragenina não causou aumento significativo, quando comparado ao grupo salina, na migração de células mononucleares para o espaço intrapleural.

Também não foi observado redução desse tipo celular após a administração de NO inalatório em diferentes doses (Figura 16, gráfico A) e nem com a administração da menor dose de NO inalatório nos diferentes tempos de inalação testados (Figura 16, gráfico B).

A. **B.**

Figura 16: Contagem de células mononucleares em lavado bronco alveolar após administração de carragenina pela injeção intrapleural. **Painel A:** Efeito do NO inalatório, administrado em diferentes doses, sobre o acúmulo de células mononucleares. **Painel B:** Efeito do NO, na dose de 13,6 ppm, administrada em tempos diferentes de inalação, sobre o acúmulo de células mononucleares.

4.12 Efeito do NO inalatório no acúmulo de neutrófilos no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.

A resposta inflamatória causada pela carragenina tem como característica a presença de infiltrado neutrofílico importante, até a 4ª hora, que é o pico máximo da resposta inflamatória causada por esse agente flogístico e formação de edema, conforme mostrado nos gráficos A e B da Figura 17.

A administração de NO inalatório, nas diferentes doses, reduz a migração de neutrófilos de forma significativa quando comparado ao grupo carragenina, conforme apresentado no gráfico A da Figura 17.

Quando a menor dose foi administrada em diferentes tempos de inalação, apenas os tempos de 5 e 15 minutos reduziram de forma significativa o acúmulo neutrofílico para o espaço intrapleurial. O tempo de 30 minutos de exposição ao NO inalatório na dose de 13,6 ppm, causou efeito contrário, aumentando a concentração de neutrófilos no sítio inflamatório (Figura 17, gráfico B).

A.

B.

Figura 17: Contagem de neutrófilos em lavado bronco alveolar após administração de carragenina pela injeção intrapleural. **Painel A:** Efeito do NO inalatório, administrado em diferentes doses, sobre o acúmulo de neutrófilos. **Painel B:** Efeito do NO, na dose de 13,6 ppm, administrada em tempos diferentes de inalação, sobre o acúmulo de neutrófilos.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos o possível efeito anti-inflamatório do NO administrado por via inalatório em modelos experimentais de inflamação periférica, ou seja, nos modelos de edema de pata e pleurisia induzido por carragenina em camundongos. Além disso, estudamos as doses efetivas, tempos de inalação e posologia da terapia nos modelos experimentais propostos.

No primeiro grupo de experimentos (figura 06), testamos diferentes doses de NO inalado no modelo de edema de pata. Pudemos observar que a dose ótima de tratamento, ou seja, aquela que apresentou maior inibição do edema de pata em camundongos foi de 13,6 ppm. Como já mencionado na introdução deste trabalho, não se conhece a concentração mínima alveolar de NO inalado necessária para causar dilatação do leito vascular pulmonar, e nem aquela capaz de apresentar efeitos sobre o processo inflamatório. No entanto, doses consideradas extremamente baixas quanto 250 ppb foram suficientes para induzir vasodilatação pulmonar (ZAPOL, 1996). Segundo WANG et al (2003), doses acima de 100 ppm já são consideradas altas quando utilizadas para tratamento em humanos, podendo acarretar toxicidade.

Nossos resultados parecem estar de acordo com estes autores, tendo em vista que a menor dose apresentou efeitos benéficos no modelo utilizado. As doses mais altas empregadas neste primeiro protocolo experimental podem talvez ter acarretado danos celulares ou teciduais, evidenciando possível toxicidade. Por outro lado, do ponto de vista conceitual, a ausência de efeito não significa efeito negativo, pró-inflamatório ou tóxico. Neste sentido, fez-se necessários experimentos adicionais com doses ainda menores de inalação para investigarmos se poderia haver melhora do efeito anti-inflamatório. Este conceito é corroborado pelo fato de que os experimentos realizados para a determinação dos níveis de nitração protéica no tecido da pata (figura 07) foram reduzidos após a inalação do NO. Mesmo nas doses mais elevadas, os níveis de nitração observados foram menores quando comparadas ao grupo carragenina. Sendo assim, ao menos no que diz respeito ao estresse oxidativo tecidual, a inalação de NO não apresentou efeitos que possam ser considerados tóxicos.

Tendo em vista limitações técnicas do equipamento utilizado para a realização da inalação, optou-se por testar tempos diferentes de inalação, consequentemente, doses diferentes. Devemos ressaltar, que no caso de administração por via inalatória, a dose é função do fluxo de gás insuflado e do tempo de exposição ao agente farmacológico. Neste contexto, Nagasaka et al. (2008) em modelos de lesão por reperfusão em situações de isquemia tecidual, concluíram que períodos curtos de inalação (0,5 e 5 min) de NO podem diminuir o tamanho da área de infarto cardíaco em camundongos. Assim, resolvemos investigar qual o melhor tempo de inalação do NO.

A curva de tempo de inalação vs efeito (figura 8) levou-nos a concluir que o tempo de inalação de 10 minutos foi mais efetivo em reduzir o edema inflamatório do que 2 e 5 minutos de exposição. Sendo assim, podemos pensar que também um tempo mínimo de exposição ao agente farmacológico se faz necessário para a observação de efeitos anti-inflamatórios do NO. No que diz respeito aos níveis de nitração protéica analisados por western blotting, pudemos constatar que não houveram diferenças observáveis entre os três tempos de inalação. Deve-se ressaltar que, tanto os grupos que receberam o tratamento com NO quando o grupo tratado com Indometacina apresentaram níveis de nitração mais baixo do que o grupo carragenina. Neste caso podemos sugerir que os efeitos de ambos os tratamentos sobre a migração de importantes células inflamatórias como os neutrófilos podem influenciar o resultado observado. Aspectos de migração celular serão discutidos mais a frente.

Na tentativa de estabelecermos uma posologia ideal para o tratamento com NO inalatório no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina, o número de administrações do NO inalatório (Figura 10) foi também analisado. Neste grupo de experimentos, pudemos observar que em todos os grupos que receberam os tratamentos com o NO inalado, houve redução do edema de pata a partir da 2ª hora, efeito este que se estendeu até a 6ª hora. No entanto, não pudemos observar diferenças significativas entre os grupos tratados com 01, 02 ou 03 aplicações de NO. Como uma única administração de NO já foi suficiente para obtenção de uma resposta anti-inflamatória significativa, optamos por esse esquema posológico para os demais experimentos. Deve-se ressaltar que o efeito da indometacina foi maior do que o NO inalatório, tendo se mantido até a 12ª hora.

Acreditamos que os grupos que receberam mais de uma administração de iNO não apresentaram diferenças significativas com o grupo que recebeu uma única dose, pois de acordo com Fernandes et al. (2002) se acaso desejamos investigar o efeito anti-inflamatório do NO, este parece ter maior importância na primeira fase da inflamação, quando o controle local dos eventos que afetam a microcirculação (vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, adesão e transmigração de células inflamatórias) parecem ter maior importância.

Tratando-se de modelo de edema de pata, a formação do edema inflamatório pode ser significativamente influenciada por aspectos microvasculares. O movimento do fluido dentro e fora da microcirculação é regulado pelo equilíbrio entre a pressão hidrostática intravascular, que tende a forçar a saída do fluido dos vasos, e pelo efeito oposto da pressão osmótica exercida pelas proteínas plasmáticas, que tendem a reter o fluido dentro dos vasos - fenômeno conhecido como lei de Starling (TROWBRIDGE e EMLING, 1996). Porém durante a resposta inflamatória aguda ocorre aumento da pressão hidrostática na microcirculação e passagem dos fluidos através dos pequenos vasos tornando-os mais permeáveis às proteínas plasmáticas. Quando estas proteínas deixam os vasos e entram no interstício, a pressão osmótica aumenta e provoca a saída de mais fluido para o interstício, originando o edema e aumentando a viscosidade sanguínea que tende a desacelerar o fluxo (estase sanguínea) e favorecer a adesão leucocitária, formando, assim, o exsudato inflamatório, principal característica da resposta inflamatória aguda (TROWBRIDGE e EMLING, 1996; MICHEL e CURRY, 1999). Neste sentido, realizamos alguns experimentos relativos aos efeitos do NO inalado sobre a pressão arterial sistêmica em ratos (dados não demonstrados). Nestes experimentos pudemos observar que a inalação do agente farmacológico não foi capaz de produzir qualquer efeito sobre a pressão arterial sistêmica. Sendo assim, podemos sugerir que o efeito do NO inalado sobre o edema inflamatório não parece ser devido a aspectos vasculares que poderiam, em tese, influenciar os resultados.

O NO é capaz de promover vasodilatação pela ativação da enzima guanilato ciclase e consequente aumento da síntese de GMPc (BRUCKDORFER, 2005). No entanto o NO se liga rapidamente a hemoglobina devido sua alta afinidade e então é inativado em poucos segundos (para revisão ver BARRETO et al., 2005), tendo seu efeito vasodilatador limitado, ao menos, teoricamente, ao pulmão, área de

influência direta do NO inalado. Já é conhecido (vide introdução) que esses efeitos melhoram a relação ventilação-perfusão e com isso melhoram a oxigenação. Por conta desses efeitos e pela sua seletividade ao leito vascular pulmonar, o iNO é amplamente utilizado em centros hospitalares para o tratamento de diversas doenças pulmonares (GRIFFITHS et al., 2005).

Na tentativa de melhor entender os mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória do NO inalado investigamos também se a formação de GMPc e AMPc poderiam estar envolvidas na redução do edema de pata. Neste contexto, realizamos o tratamento dos animais com a droga sildenafil, isoladamente ou em associação com NO inalado. O resultado obtido a partir da associação entre os tratamentos com sildenafil (inibidor de PDE - 5) e iNO (Figura 11), nos sugerem que o efeito anti-inflamatório do NO inalado poderia ser, ao menos em parte, mediado por uma via bioquímica dependente da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e produção de GMPc, uma vez que observamos um efeito potencializador da inibição do edema quando realizamos a combinação de tratamentos. Já é conhecido que o sildenafil, por si só, é capaz de diminuir o influxo leucocitário e a hiperreatividade das vias aéreas em modelos experimentais de doenças respiratórias, apresentando pois, potencial terapêutico no tratamento da asma e de doenças pulmonares obstrutivas crônicas. Entretanto, demonstrou-se que o sildenafil não é dependente de NO endógeno, pois o L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, não interferiu na ação anti-inflamatória do sildenafil (TOWARD et al., 2004). Isso explicaria porque o tratamento com sildenafil isolado (Figura 11) também foi capaz de inibir o edema de pata induzido por carragenina, bem como o NO inalado.

Ainda no intento de estudar os possíveis mecanismos de ação do efeito anti-inflamatório observado para o NO inalado, realizamos o tratamento com a droga rolipram, um inibidor de fosfodiesterase do tipo 4 (PDE - 4). É também conhecido, que o rolipram apresenta efeito anti-inflamatório em diversos modelos experimentais de inflamação e inibe a liberação de uma variedade de citocinas, incluindo o TNF- α possivelmente devido ao aumento dos níveis de AMPc (LAEMONT et al., 1999; SEKUT et al., 1995). Este ultimo apresenta especial importância no modelo de edema de pata induzido por carragenina, tendo que vista que o TNF- α é importante mediador da permeabilidade vascular, agindo sobre “tight junctions” e favorecendo

a abertura dos espaços (poros) intercelulares, permitindo o extravasamento protéico durante a resposta inflamatória (MAZZON e CUZZOCREA, 2007). Além disso, recentemente, foi apresentado no estudo de Dejana et al. (2009), que o AMPc tem relação com uma proteína denominada de Rap1, um mediador que aumenta as propriedades adesivas da E-caderina na junção endotelial. Desse modo, quando há um aumento de AMPc, há também, a estimulação de Rap 1 que age como sinalizador para controlar processos regulados pela actina na organização das junções celulares diminuindo a permeabilidade vascular por aumento da adesão da entre as E-caderinas de células endoteliais vizinhas.

Esse dado embasa o resultado por nós apresentado na Figura 12, onde o rolipram administrado sozinho como forma de tratamento também reduziu o edema de pata induzido por carragenina. Porém, diferente do ocorrido com a associação entre sildenafil e iNO, o rolipram, que aumenta níveis de AMPc, não promoveu efeito potencializador e nem somatório quando associado ao iNO. No entanto, este resultado precisa ser melhor investigado, pois a inibição do edema produzida pelo tratamento com rolipram, na dose empregada, foi altamente significativa. Neste sentido, existe a possibilidade de não ter sido observado efeito potencializador do NO inalado quando associado ao rolipram por já se ter alcançado um efeito inibitório máximo.

Alguns estudos tem demonstrado também que no pulmão, o iNO previne tanto o acúmulo de neutrófilos induzido por hemodiálise, LPS, IL-1 ou lesão de isquemia e reperfusão, quanto o extravasamento plasmático, por inibição do aumento na permeabilidade no leito vascular adjacente aos alvéolos ventilados (MALMROS et al., 1996; BARBOTIN-LARRIEU et al., 1996). Neste sentido, realizamos alguns protocolos experimentais visando investigar o papel do NO inalado sobre a migração celular para a pata, outra importante característica do processo inflamatório.

No processo inflamatório agudo predominam os neutrófilos, razão pela qual resolvemos analisar a contagem de neutrófilos em cortes histológicos da pata, bem como a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma enzima exclusiva de neutrófilos, utilizada como um marcador bioquímico indireto da infiltração de neutrófilos. Em nossos resultados demonstramos que, quando comparados ao grupo carragenina, o NO inalatório reduziu a contagem de neutrófilos em patas

edemaciadas, bem como diminuiu a atividade da MPO de maneira semelhante à indometacina (Figura 13, painéis A e B). De fato, nossos resultados estão de acordo com a literatura, onde o NO sabidamente inibe a adesão leucocitária ao endotélio vascular por interferir com a habilidade da molécula de adesão CD11/CD18 do leucócito aderir à superfície da célula endotelial, ou por suprimir a expressão de CD11/CD18 nos leucócitos que rolam pela superfície endotelial (HALLER, 1996).

Além da contagem de células a partir das lâminas histológicas, também pudemos observar que o grupo que recebeu iNO como tratamento apresentou infiltrado celular reduzido quando comparado com o grupo carragenina (Figura 14, painéis C e B), porém a redução de infiltrado celular foi menor do que o grupo que recebeu tratamento com indometacina (Figura 14, painel D).

Não podemos afirmar ao certo se este efeito de inibição da migração celular é disparado no momento que estas células circulam pela vasculatura pulmonar e recebem diretamente o gás, em outras palavras, se a exposição dos leucócitos e plaquetas ao NO enquanto eles transitam no pulmão pode inibir sua ativação em tecidos periféricos (NAGASAKA et al., 2008) ou se a produção de metabólitos intermediários resultantes da administração por via inalatória poderiam prolongar a atividade biológica do NO ou ainda, exercer seu efeito localmente, em regiões distantes daquelas onde foi administrado (GOW et al., 2004; NG e KUBES, 2003).

Fox-Robichaud e colaboradores (1998) observaram que o NO inalado reverte a vasoconstrição e diminui o recrutamento leucocitário em leitos vasculares periféricos (mesentério) depletados de NO, como no quadro de isquemia e reperfusão mesentérica. Dessa forma, os autores sugerem que o NO inalado é capaz de promover efeitos à distância e que possivelmente um mecanismo de transporte às regiões periféricas estaria envolvido nessa ação.

Os efeitos do tratamento com NO inalado sobre a migração celular, especialmente sobre a migração de neutrófilos nos remete de volta a questão da expressão de proteínas nitradas no sítio inflamatório, ou seja, na pata inflamada dos animais. A significativa inibição da migração de neutrófilos observada neste trabalho, pode explicar, ao menos em parte, a redução da nitração protéica após o tratamento com NO inalado, visto que a enzima mieloperoxidase, presente em neutrófilos, é capaz de nitrar proteínas (LAU e BALDUS, 2006).

Com o intuito de investigar se os efeitos anti-inflamatórios do NO inalado apresentavam alguma relação específica com o modelo experimental utilizado, de edema de pata, realizamos alguns experimentos adicionais, empregando o modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. As figuras 15, 16 e 17 demonstram os resultados obtidos nestes protocolos experimentais. Neste modelo, onde avaliamos essencialmente a migração celular ou acúmulo celular na cavidade pleural, observamos um importante efeito de inibição da migração celular, tanto para o número total de leucócitos, quanto de neutrófilos. Devemos ressaltar, que o efeito observado da inalação do NO foi especialmente significativo quando analisamos a migração de neutrófilos. Além disso, a exemplo do que foi observado no modelo de edema de pata, a dose mais baixa (13,6 ppm) foi também responsável pelo efeito ótimo sobre a migração de neutrófilos, sendo responsável por praticamente abolir a migração destas células para a cavidade pleural. Pudemos ainda verificar, que os tempos de inalação de 5 e 15 minutos foram significativos, enquanto o tempo de 30 minutos não apresentou efeito inibitório.

Sendo assim, podemos perceber que o efeito do NO inalado foi altamente relevante quanto a inibição da migração de neutrófilos, não somente no modelo de edema de pata, como também na pleurisia induzida por carragenina.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que o NO administrado por via inalatória, na dose de 13,6 ppm, com tempo de inalação de 10 minutos e em dose única foi capaz de reduzir o edema de pata induzido pela injeção de carragenina, bem como diminuir o infiltrado de neutrófilos, evidenciando a importante atividade anti-inflamatória desse agente.

Além disso, há indícios que o NO possa desempenhar seus efeitos anti-inflamatórios pela via bioquímica do GMPc, tendo em vista o efeito potencializador na redução do edema, observado quando administrado em associação com sildenafil, inibidor de fosfodiesterase V. No entanto, estudos adicionais se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS*

APLIN, A. E.; HOWE, A.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.**, v.50, p.197–263, 1998.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D. A. Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Adv. Pharmacol.**, v.35, p. 27-78, 1996.

ARUL, N.; KONDURI, G. G. Inhaled Nitric Oxide for Preterm Neonates. **Clin. Perinatol.**, v. 36, p.43–61, 2009.

BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M.. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation **Mediators Inflamm.** v. 5, n. 5, p. 305–323, 1996.

BARBOTIN-LARRIEU, F.; MAZMANIAN, M.; BAUDET, B.; DETRUIT, H.; CHAPELIER, A.; LIBERT, J. M.; DARTEVELLE, P.; HERVE, P. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by inhaled nitric oxide in neonatal piglets. **J. Appl. Physiol.**, v. 80, p. 782-788, 1996.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quim. Nova**, v. 28, p.1046-54, 2005.

BENOIT, J. N., ZAWIEJA, D. C., GOODMAN, A. H., GRANGER, H. J. Characterization of intact mesenteric lymphatic pump and its responsiveness to acute edemagenic stress. **Am J Physiol.** v.257, n.6, p. H2059-2069, 1989, Pt 2.

BRADLEY PP, PRIEBAT DA, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marked. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRETT, S. J.; ROWAN, W.; SMITH, M.; BARTHOLOMEW, M.; TITE, J. P. Differential functional effects of a humanized anti-CD4 antibody on resting and activated human T cells. **Immunology**, v. 91, n. 3, p. 346-353, 1997.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol. Aspects Med.**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 766-775, 2007.

CAMPOS, M. M.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappa B pathways. **Br. J. Pharmacol.** v.127, n. 8, p.1851-1859, 1999.

CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z.B.; TOSTES, R.C.; NIGRO, D. Funções normais do endotélio – Uma visão geral. In: LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio & doenças cardiovasculares**. São Paulo. Ed. Atheneu, 2003. p. 17-32.

CHATKIN, J. M. Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. **J. Pneumol.**, v. 26, n. 1, p. 36-43, 2000.

CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADSKI, J. D.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 2105-2110, 1982.

COCKS, T. M; ANGUS, J. A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature**, v. 305, p. 627-630, 1983.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; WEBB, D. J. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. **Urology**, v. 60, p. 4-11, 2002.

COSTA, S. K. P.; ESQUISATTO, L. C. M.; CAMARGO, E.; GAMBERO, A.; BRAIN, S. D. ; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Comparative effect of Phoneutria nigriventer spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. **Life Sci.**, v. 69, p. 1573-1585, 2001.

DAL SECCO, D.; PARON, J. A.; OLIVEIRA, S. H.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, n. 3, p. 153-64, 2003.

DE MEY, J. G.; CLAEYS, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 222, p. 166-173, 1982.

DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B. M. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. **Dev. Cell**, v. 16, n. 17, p. 209-221, 2009.

DI ROSA, M. Pharmacological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmac.** v.24, p. 89-102, 1972.

DI ROSA, M.; GIROUD J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**. v.104, p. 15-29, 1971.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **Eur J Pharmacol**. v. 4, n. 3, p.340- 342, 1968.

DUDZINSKI, D. M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 46, p. 235–76, 2006.

FARSKY, S. H. P.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; PROTO, S. Z.; FERREIRA J. R., J. M. C.; MELLO, S. B. V. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. **Inflamm. Res.**, v. 53, p. 442–452, 2004.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. EDHF: an update. **Clin. Sci.**, v. 117, p. 139–155, 2009.

FERREIRA, H. H.; BEVILACQUA, E.; GAGIOTI, S. M.; DE LUCA, I. M.; ZANARDO, R. C.; TEIXEIRA, C. E.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. **Eur J Pharmacol.** v. 358, n. 3, p.253-259, 1998.

FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflamm. Res.**, v. 51, p. 377-384, 2002.

FINER, N. N.; BARRINGTON, K. J. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. **Cochrane Database Syst. Rev.**, n. 2, p. CD000399, 2000.

Foreman JC. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. **Int Arch Allergy Appl Immunol.** v. 82, n. 3-4, p.366 - 371, 1987.

FOSTER, M. W.; McMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **TRENDS Mol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 160-168, 2003.

FOX-ROBICHAUD, A.; PAYNE, D.; HASAN, S. U.; OSTROVSKY, L.; FAIRHEAD, T.; REINHARDT.; KUBES, P. Inhaled NO as a Viable Antiadhesive Therapy for Ischemia/Reperfusion Injury of Distal Microvascular Beds. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 2497-2505, 1998.

FURCHGOTT, R. F. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 2, p. 173 - 176, 1981.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br. J. Anaesth.**, v. 93, p. 105-113, 2004.

GHAFOURIFAR P.; PARIHAR, M. S.; NAZAREWICS, R.; ZENEB, W. J.; PARIHAR, A. Detection Assays for Determination of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase Activity; Advantages and Limitations. **Methods Enzymol.**, v. 440, p. 317-34, 2008.

GIRALDELO, C. M.; ZAPPELLINI, A.; MUSCARA, M. N.; DE LUCA, I. M.; HYSLOP, S.; CIRINO, G.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. **Eur J Pharmacol.** v.257, n. 1-2, p.87-93, 1994.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 11038-11043, 1998.

GONÇALVES DE MORAES, V. L.; SINGER, M.; VARGAFTIG, B. B.; CHIGNARD, M. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 631-636, 1998.

GOW, A. J.; FARKOUH, C.R.; MUNSON, D. A.; POSENCHEG, M. A.; ISCHIROPOULOS, H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 287, p. L262–L268, 2004.

GOZDZIK, W.; ALBERT, J.; HARBUT, P.; ZIELINSKI, S.; RYNIAK, S.; LINDWALL, R.; DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; KÜBLER, A.; FROSTELL, C. Prolonged exposure to inhaled nitric oxide transiently modifies tubular function in healthy piglets and promotes tubular apoptosis. **Acta Physiol.**, n. 1-8, 2008.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. J. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **Leukoc Biol.** v. 55, n. 5, p.662-675, 1994.

GRIFFITHS, M. J. D.; EVANS, T. W. Inhaled Nitric Oxide Therapy in Adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, n. 25, p. 2683-2695, 2005.

GUIDOT, D. M.; HYBERTSON, B. M.; KITLOWSKI, R. P.; REPINE, J. E. Inhaled NO prevents IL-1-induced neutrophil accumulation and associated acute edema in isolated rat lungs. **Am J Physiol.** v.271, n. 2 Pt 1, p. L225-L229, 1996.

HALLER, H. Hypertension, the endothelium and the pathogenesis of chronic vascular disease. **Kid. Blood Press. Res.**, v. 19, p. 166-171, 1996.

HENRIQUES, M. G., WEG, V. B., MARTINS, M. A., SILVA, P. M., FERNANDES, P. D., CORDEIRO, R. S., VARGAFTIG, B. B. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br J Pharmacol.** v. 99, n. 1, p.164-168, 1990.

HENRIQUES, M. G., SILVA, P. M., MARTINS, M. A., FLORES, C. A., CUNHA, F. Q., ASSREUY-FILHO, J., CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res.** v. 20, n. 2, p. 243 - 249, 1987.

HALLMAN, M.; BRY, K.; LAPPALAINEN, U. A mechanism of nitric oxide-induced surfactant dysfunction. **J. Appl. Physiol.**, v. 80, n. 6, p. 2035-43, 1996.

HANAFY, K. A; KRUMENACKER, J. S.; MURAD F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Med. Sci. Monit.**, v. 7, n. 4, p. 801-819, 2001.

HICKEY, M. J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. **Clin Sci (Lond).** v.100, n. 1, p. 1-12, 2001.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. **Exp Physiol.** v.82, n. 2, p. 339-348, 1997.

HICKEY, M. J.; SHARKEY, K. A.; SIHOTA, E. G.; REINHARDT, P. H.; MACMICKING, J. D.; NATHAN, C.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **FASEB J.** v.11, n. 12, p. 955-964, 1997.

HOUSLAY, M. D. Adaption in cAMP signalling processes: a central role in cyclic AMP phosphodiesterases. **Sem. Cell Biol.**, v. 9, p. 161-167, 1998.

HUMPHRIES, M. J.; NEWHAM, P. The structure of cell-adhesion molecules. **Trends Cell Biol.**, v. 8, p. 78–83, 1998.

HYNES, R. O. Cell adhesion: old and new questions. **Trends Cell Biol.**, v. 9, p. M33–37, 1999.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 211, p. 177-182, 1992.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

INDER, T. E.; GRAHAM, P. J.; WINTERBOURN, C. C.; AUSTIN, N. C.; DARLOW, B. A. Plasma vitamin A levels in the very low birthweight infant-relationship to respiratory outcome. **Early Hum Dev.** v.52, n. 2, p.155-168, 1998.

JIA, L.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; STAMLER, S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic of blood involved in vascular control. **Nature**, v. 380, p. 221-226, 1996.

JOCKUSH, B. M.; BUBECK, P.; GIEHL, K.; KROEMKER, M.; MOSCHNER, J.; ROTHKEGEL, M.; RÜDIGER, M.; SCHLÜTER, K. The molecular architecture of focal adhesions. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 11, p. 379–416, 1995.

JULIANO, R. L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin-Superfamily Members. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 283–323, 2002.

KASS, D. A.; TAKIMOTO, E.; NAGAYAMA, T.; CHAMPION, H. C. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, n. 2, p. 303-314, 2007.

KAVANAGH, B. P.; PEARL, R.G. Inhaled nitric oxide in anesthesia and critical care medicine. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 33, p. 181-210, 1995.

KEELY, P.; PARISE, L.; JULIANO, R. Integrins and GTPases: role in tumor cell growth control, motility, and invasion. **Trends Cell Biol.**, v. 8, p.101–106, 1998.

KINSELLA, J. P. Inhaled nitric oxide in the term newborn. **Early Hum. Dev.**, v. 84, p. 709–716, 2008.

KINSELLA, J.P.; NEISH, S.R.; IVY, D.D.; SHAFFER, E.; ABMAN, S.H. Clinical resosnses to rolonged treatment of ersistent pulmonary hypertension of the newborn with low doses of inhaled nitric oxide. **J. Pediatr.**, v. 123, p. 103-108, 1993.

KLINGER, J. R. Inhaled Nitric Oxide in ARDS. **Crit. Care Clin.**, v. 18, n. 1, p. 45-68, 2002.

KNOWLES, R. G; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Bioch. J.**, v. 298, p. 249-258, 1994.

KOSONEN, O; KANKAANRANTA, H.; UOTILA, J; MOILANEN, E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. **European Journal of Pharamacology.** v.394, p. 149-156, 2000.

KUBES, P.; GRANGER, D. N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. **Am. J. Physiol.**, v. 262, n. 2, p. H611-5, 1992. Pt. 2.

KUBES, P.; KANWAR, S.; NIU, X. F.; GABOURY, J. P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB J.** v. 7, n. 13, p. 1293-1299, 1993.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: Na endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v.88, p. 4651-4655, 1991.

KUMAR, P.; SHEN, Q.; PIVETTI, C. D.; LEE, E.S; WU, M. H.; YUAN, S. Y. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. **Exp. Rev. Mol. Med.**, v.11, n. 19, p. 1-20, 2009.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Inflamação Aguda e Crônica. In _____ **Patologia Básica**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994. p21-39.

LAEMONT, K. D.; SCHAEFER, C. J.; JUNEAU, P. L.; SCHRIER, D. J. Effects of the phosphodiesterase inhibitor on streptococcal cell wall-induced arthritis in rats. **Inter. J. Immunopharmacol.**, v. 21, p. 711-725, 1999.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol. Terap.** v. *in press*, 2006.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 10, p. 787-95, 2002.

LEFER, A. M.; LEFER, D. J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. **Cardiovasc Res.** v.32, n. 4, p.743-51, 1996.

LEFER, D. J.; SCALIA, R.; CAMPBELL, B.; NOSSULI, T.; HAYWARD, R.; SALAMON, M.; GRAYSON, J.; LEFER, A. M. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 684-691, 1997.

LELAMALI, K.; WANG, W.; GENGARO, P.; EDELSTEIN, C.; SCHRIER, R. W. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on endotoxin-induced leukocyte adhesion to endothelium. **J Cell Physiol.** v.188, n. 3, p.337-342, 2001.

LEWIS, G. P. Responses of phagocytic cells. In _____ **Mediators of Inflammation**. Bristol: Wright, 1986. pag.127

LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO-PEREYRA, L. H.; MIRMIRAN, R.; PAEZ-ROLLYS A. J. Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. **Transplantation.** v. 61, n. 2, p.179-183, 1996.

LU, M. P.; DU, L. Z.; GU, W.Z.; CHEN, X.X. Nitric oxide inhalation inhibits inducible nitric oxide synthase but not nitrotyrosine formation and cell apoptosis in rat lungs with meconium-induced injury. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26, n. 9, p.1123-1129, 2005.

LUNN, R.J. Inhaled nitric oxide therapy. **Mayo Clin. Proc.**, v. 70, n. 3, p. 247-55, 1995.

MAJNO, G. Man and wound in the ancient world .The healing hand. **Cambridge; Harvard University Press**, v. 128, n. 4, p. 318, 1975.

MALMROS, C.; BLOMQUIST, S.; DAHM, P.; MARTENSSON, L.; THORNE, J. Nitric oxide inhalation decreases pulmonary platelet and neutrophil sequestration during extracorporeal circulation in the pig. **Crit. Care Med.**, v. 24, p. 845-849, 1996.

MATALON, S.; DEMARCO, V.; HADDAD, I.Y.; MYLES, C.; SKIMMING, J.W.; SCHÜRCH, S.; CHENG, S.; CASSIN, S. Inhaled nitric oxide injures the pulmonary surfactant system of lambs in vivo. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 2., p. L273-80, 1996. Pt. 1.

MATHRU, M.; HUDA, R.; SOLANKI, D. R.; HAYS, S.; LANG, J. D. Inhaled nitric oxide attenuates reperfusion inflammatory responses in humans. **Anesthesiology**, v. 106, n. 2, p. 275-82, 2007.

MAZZON, E., CUZZOCREA, S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. **Respir Res.** v. 30, n. 8, p.75, 2007.

MICHEL, C. C.; CURRY, F. E. Microvascular Permeability. **Physiol. Rev.**, v. 79, n. 3, p. 703-761, 1999.

MILLER, C.; MC MULLIN, B.; GHAFARI, A.; STENZLER, A.; PICK, N.; ROSCOE, D.; GHAHARY, A.; ROAD, J.; AV-GAY, J. Gaseous nitric oxide bactericidal activity retained during intermittent high-dose short duration exposure. **Nitric Oxide**, v. 20, p.16–23, 2009.

MILLER, S. S.; RHINE, W. D. Inhaled nitric oxide in the treatment of preterm infants. **Early Hum. Dev.**, v. 84, p. 703–707, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p. 137-142, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-143, 1991.

MORENO, I.; MIR, A.; VICENTE, R.; PAJARES, A.; RAMOS, F.; VICENTE, J. L.; BARBERA, M. Analysis of Interleukin-6 and Interleukin-8 in Lung Transplantation: Correlation With Nitric Oxide Administration. **Transpl. Proc.**, v. 40, p. 3082–3084, 2008.

MOURA, A. C., LEONARDO, P. S., HENRIQUES, M. G., CORDEIRO, R. S. Opposite effects of *M. leprae* or *M. bovis* BCG delipidation on cellular accumulation into mouse pleural cavity. Distinct accomplishment of mycobacterial lipids in vivo. **Inflamm Res.** v. 48, n. 6, p.308 – 313, 1999

NAGASAKA, Y.; FERNANDEZ, B. O.; GARCIA-SAURA, M. F.; PETERSEN, B.; ICHINOSE, F.; BLOCH, K. D.; FEELISCH, M.; ZAPOL, W. M. Brief Periods of Nitric Oxide Inhalation Protect against Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury. **Anesthesiology**, v. 109, p. 675–82, 2008.

NG, E. S. M.; KUBES, P. The physiology of S-nitrosothiols: carrier molecules for nitric oxide. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, p. 759 – 764, 2003.

NG, E. S. M.; JOURD'HEUIL, D.; McCORD, J. M.; HERNANDEZ, D.; YASUI, M.; KNIGHT D.; KUBES, P. Enhanced S-Nitroso-Albumin Formation From Inhaled NO During Ischemia/Reperfusion. **Circ. Res.**, v. 94, p. 559-565, 2004.

NOVAES, M. R. C. G., BEAL, F. L. R. Farmacologia da L-arginina em pacientes com câncer. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 50, n. 4, p. 321-325, 2004.

NURIEL, T.; DEEB, R. S.; HAJJAR, D. P.; GROSS, S. S. Protein 3-nitrotyrosine in complex biological samples: quantification by high-pressure liquid chromatography/electrochemical detection and emergence of proteomic approaches for unbiased identification of modification sites. **Methods Enzymol.**, v. 441, p.1-17, 2008.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PAPADIMOS, T. J. The beneficial effects of inhaled nitric oxide in patients with severe traumatic brain injury complicated by acute respiratory distress syndrome: a hypothesis. **J. Trauma Manag. Out.**, v. 2, p. 1-5, 2008.

PARISE, L. V.; LEE, J. W.; JULIANO, R. L. New aspects of integrin signaling in cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 10, p. 407–14, 2000.

PHILLIPS, D.R.; CHARO, I.F.; SCARBOROUGH, R.M. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. **Cell**, v. 65, p. 359–362, 1991.

PORTA, N. F.; STEINHORN, R. H. Inhaled NO in the experimental setting. **Early Hum. Dev.**, v. 84, n. 11, p. 717-23, 2008.

REID, M.B. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. **Acta Physiol. Scand.**, v. 162, n. 3, p. 401-409, 1998.

REIS, M. L. C. **Efeito do tratamento com selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina na alergia alimentar induzida em camundongos.** 106 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ROBERTS, J. D.; POLANER, D. M.; LANG, P.; ZAPOL, W. M. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. **Lancet**, v. 340, n. 8823, p. 818-819, 1992.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute Inflammation: A Review. **Am. J. Pathol.**, v. 86, n. 1, p.183-276, 1977.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan –induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Relationship Between Nitric Oxide and Prostaglandins in carrageenin Pleurisy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 1113-1117, 1998.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 286, p. 219-222, 1995.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93–151, 2006.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**. v. 18, n. 3/4, p. 439-446, 1986

SEKUT, L.; YARNALL, D.; STIMPSON, S. A.; NOEL, L. S.; BATEMAN-FITE, R.; CLARK, R. L.; BRACKEEN, M. F.; MENIUS JR, J. A.; CONNOLLY, J. R. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 100, p.126-132, 1995.

SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and Proresolvin Lipid Mediators. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 3, p. 279-312, 2008.

SERHAN, C. N., SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.** v.6, p. 1191–1197, 2005.

SHATTIL, S.J.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin signaling: the platelet paradigm. **Blood**, v. 91, p. 2645–2657, 1998.

SCHERRER, U.; VOLLENWEIDER, L.; DELABAYS, A.; SAVCIC, M.; EICHENBERGER, U.; KLEGER, G. R; FIKRLE, A.; BALLMER, P. E; NICOD, P.; BARTSCH, P. Inhaled nitric oxide for high-altitude pulmonary edema. **N. Engl. J. Med.** v. 334, n. 10, p.624-629, 1996.

SHUKLA, N.; MUZAFFAR, S.; ANGELINI, G. D.; ZACHAROWSKI, K.; JEREMY, J. Y. Possible Mechanisms Underlying the Effects of Inhaled Nitric Oxide. **Anesthesiology**, v. 107, n. 4, p. 677-678, 2007.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301–314, 1994.

TAVARES, F. A. P. et al., Fundamentos para o uso terapêutico do óxido nítrico pela via inalatória. **Arq. Brás. Cardiol.**, v. 64, n. 1, p. 45 – 52, 1995.

TODA, N. Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamine in isolated arteries of dog. **Br. J. Pharmacol.**, v. 81, n. 2, p.301-307, 1984.

TOWARD, T. J.; SMITH, N.; BROADLEY, K. J. Effect of phosphodiesterase-5 inhibitor, Sildenafil (Viagra), in animal models of airways disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 169, p. 227-234, 2004.

TRONCY, E.; FRANCOEUR, M.; BLAISE, G. Inhaled nitric oxide: clinical applications, indications, and toxicology. **Can. J. Anaesth.**, v. 44, n. 9, p. 973-88, 1997.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Inflamação**: Uma revisão do processo. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1996. p. 172.

TSAO, P.S.; WANG, B. Y., BUITRAGO, R.; SHYY, J. Y.J., COOKE, J. P. Nitric Oxide Regulates Monocyte Chemotactic Protein-1. **Circulation**. v. 96, p.934-940, 1997.

UENO, H.; KANELAKIS, P.; AGROTIS, A.; BOBIK, A. Blood flow regulates the development of vascular hypertrophy, smooth muscle cell proliferation, and endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **Hypertension**. v. 36, n. 1, p. 89-96, 2000.

VALLE, C. C., HACAD, E., SUDO, L. S., GARCIA-LEME, J. Endocrine disorders render rats hyporeactive to non-steroidal but not to steroidal anti-inflammatory drugs. **Braz J Med Biol Res**. v.18, n. 3, p.341 - 347, 1985.

VANE, J. R. Prostaglandins as mediators of inflammation. **Adv Prostaglandin Thromboxane Res.**, v. 2, p.791-801, 1976.

VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v. 38, p. 97-120, 1998.

VAN BUREN, C. T., RUDOLPH, F. B., KULKARNI, A., PIZZINI, R., FANSLOW, W. C., KUMAR, S. Reversal of immunosuppression induced by a protein-free diet: comparison of nucleotides, fish oil, and arginine. **Crit Care Med**. v. 18, n. 2, p. S114 - 117, 1990.

VINEGAR, R.; MACKLIN, A. W.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Histopathological and pharmacological study of carrageenin inflammation in the rat. **Pharmacologist**. v. 13, p. 284-289, 1971

WAISMAN, D.; BROD, V.; DICKSTEIN, R.; ABRAMOVICH, A.; ROTSCCHILD, A.; BITTERMAN, H. Effects of inhaled nitric oxide on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Shock**, v. 23, n. 2, p. 150-155, 2005.

WALLEZ, Y.; HUBER, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, p. 794-809, 2008.

WANG, T.; EL KEBIR, D.; BLAISE, G. Inhaled nitric oxide in 2003: a review of its mechanisms of action. **Can. J. Anesth.**, v. 50, n. 8, p. 839–846, 2003.

WEINBERGER, B.; LASKIN, D. L.; HECK, D. E.; LASKIN, J. D. The Toxicology of Inhaled Nitric Oxide. **Toxicol. Sci.**, v. 59, p. 5–16, 2001.

WINTER, C.A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin – induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med.**, v. 111, p. 544-547, 1962.

ZAPOL, W. M. Inhaled nitric oxide. **Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.**, v. 109, p. 81-83, 1996.

ZAWADZKI, J. V., FURCHGOTT, R. F., CHERRY, P. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. **Fed Proc.** v. 40, p. 689, 1981.

ZAWIEJA, D. C. Lymphatic microcirculation. **Microcirculation.** v. 3, n. 2, p. 241-243, 1996.

ZHOU, L.; ZHU, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation and clinical implications. **Nitric Oxide**, v. 20, n. 4, p. 223-230, 2009.