

# EFEITO DA TERAPIA COM ÓXIDO NÍTRICO INALADO NO MODELO DE PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

**Leonardo, P.S.L.M.<sup>1</sup>, Coelho, C.F.<sup>2</sup>, Teixeira, S.<sup>3</sup>, Muscará, M.N.<sup>4</sup>, Ribeiro, J.C., Cogo, J.C., Lopes -Martins, R.A.B.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> - Fisioterapeuta, Mestranda em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP.

<sup>2</sup> - Fisioterapeuta, Mestre em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP. Doutoranda em Farmacologia – ICB-USP.

<sup>3</sup> - Química, Pós-Doutoranda em Farmacologia pelo Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup> - Químico, Pós-Doutorado em Farmacologia pela Universidade de Calgary, Chefe do Laboratório de Bioquímica dos Radicais Livres do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

<sup>5</sup> - Biólogo, Pós-Doutorado em Farmacologia pelo Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Chefe do Grupo de Pesquisas em Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP. e-mail: rlopes@univap.br

**Palavras-chave:** Óxido Nítrico; Pleurisia; Inflamação; Camundongos;  
**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

**Resumo-** O Óxido Nítrico (NO), uma molécula gasosa gerada enzimaticamente a partir da L-arginina, demonstrou participar em lesões teciduais em um número de doenças inflamatórias. A resposta inflamatória aguda depende da liberação de mediadores químicos que causam a formação do edema e o acúmulo de neutrófilos polimorfonucleares. Há evidências controversas do NO na fisiopatologia do processo inflamatório como molécula pró ou anti-inflamatória. O objetivo do atual estudo foi investigar o efeito de NO inalatório na pleurisia induzida por carragenina em camundongos. Os experimentos foram realizados em camundongos Swiss, machos, pesando entre 15 e 20g. A pleurisia foi induzida por uma injeção intratorácica de carragenina (500µg/cavidade). A inalação do NO foi realizada 30 minutos após e antes a injeção de carragenina em tempos e fluxos diferentes. Nossos resultados demonstram inibição significativa da migração de células inflamatórias para a cavidade pleural, induzida por carragenina, após tratamento com óxido nítrico inalatório.

## Introdução

A resposta inflamatória é um mecanismo fisiopatológico básico que acompanha uma variedade de doenças, envolvendo interações complexas entre células inflamatórias (circulantes e residentes) e células vasculares (células endoteliais e células de músculo liso) (Tedgui e Mallat, 2001), com objetivo final de eliminar do organismo a causa inicial da lesão e suas conseqüências (Kumar et al., 1994).

A inflamação aguda refere-se à resposta que começa de maneira abrupta e precoce, sendo caracterizada por três eventos principais mediados por moléculas solúveis ou por células do sistema imune: (1) vasodilatação e lentificação do fluxo sanguíneo local sinalizando calor e rubor; (2) permeabilidade vascular aumentada, ambos eventos, conduzindo ao extravasamento de proteínas, assim como o recrutamento de leucócitos para o espaço extravascular e

subseqüente formação de edema (ou tumor) e (3) a liberação de uma variedade de materiais pró-inflamatórios que provocam dor (Tombridge, 1996; Yoshikai, 2001; Al Naemi e Baldwin, 1999; Webster e Galley, 2003;).

O óxido nítrico é uma pequena molécula lipofílica e quimicamente instável, que atende muito bem os papéis para os quais parece ser designada. O óxido nítrico é capaz de permear rapidamente as membranas biológicas, o que lhe confere um grande poder, de após sua liberação, interagir rapidamente com a guanilato ciclase solúvel localizada em outras células próximas. Portanto, o óxido nítrico sintetizado nas células endoteliais se difundem rapidamente para fora das células de origem, para as células musculares lisas subjacentes, causando relaxamento, e para as plaquetas no lúmen do vaso, inibindo a adesão e a agregação destas (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1988;).

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).

Na verdade, o papel do óxido nítrico no processo inflamatório é ainda bastante controverso. 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.

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, injúria 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.

Os objetivos do presente estudo foram de analisar a ação do NO inalado, em camundongos, no modelo de pleurisia após o estímulo com carragenina.

Todos os experimentos foram realizadas de acordo com as normas da Universidade do Vale Paraíba com relação às exigências e cuidados com os animais. Os experimentos foram realizadas nos camundongo C57Bl/6 machos pesando entre 20 e 25 g mantidos em condições padrão de temperatura (22-25°C), e umidade relativa (40-60%) com do ciclo claro/escuro, e livre acesso a comida e água. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Todos os animais foram colocados em uma caixa comum e divididos aleatoriamente em grupos de seis animais.

#### **A indução da pleurisia em camundongo**

A reação de pleurisia foi induzida por injeção intratorácica (i.t.) de 100 microlitros da solução agonista (Carragenina, 500 mg). Resumidamente, seringas de 1 mL com agulhas 13 x 5 foram utilizadas, sendo adaptadas através do uso de um cursor, passando a medir aproximadamente 3 mm de comprimento. A agulha é introduzida do lado direito da cavidade torácica dos camundongos para realização da injeção do estímulo, e um volume igual de salina estéril (100µl) foi injetado nos animais do grupo controle.

#### **Contagem total de Leucócitos**

Após quatro horas do desafio com carragenina, os animais foram sacrificados com inalação do CO<sub>2</sub>. O tórax foi imediatamente aberto e a cavidade pleural lavada com 1 ml de PBS heparinizado (20 IU.ml<sup>-1</sup>) e o volume total foi recuperado. A contagem total das células da cavidade pleural foi realizada em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em N<sup>o</sup> total de células/cavidade.

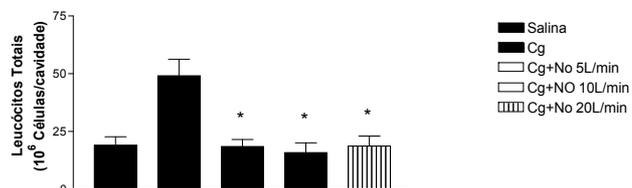
#### **Contagens dos leucócitos diferenciais**

Para a contagem diferencial de leucócitos, alíquotas de 100 µl da suspensão celular foram utilizados para o preparo de citoesfregaço, com uso de citocentrífuga (Shandon) A coloração foi feita pelo método de Mayi-Grunwald-Giemsa e a contagem diferencial das células foi realizada em microscópio óptico com objetivo de imersão em óleo, com aumento de 1.000 vezes.

#### **Inalação do Óxido Nítrico**

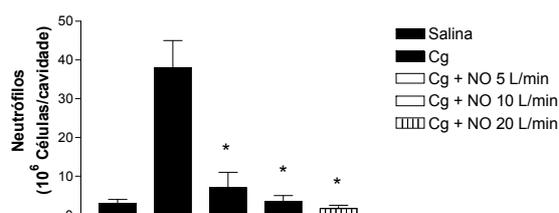
Para realização da terapia com NO inalatório os animais foram colocados em uma caixa de plástico transparente com altura de 26,2 cm, base de 17,7 cm e largura de 14,7 cm com um adaptador para conexão da mangueira condutora do gás.

A Inalação com óxido nítrico foi capaz de reduzir significativamente o número total de leucócitos que migraram para a cavidade pleural, em resposta ao estímulo da carragenina (Fig. 01).



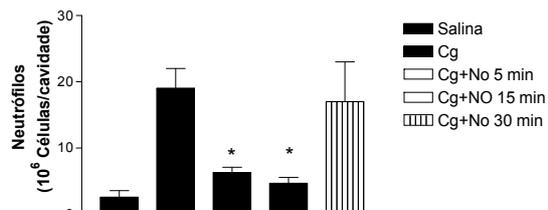
**Figura 01** – Migração de leucócitos para a cavidade pleural de camundongos, após estímulo com carragenina e tratamento com óxido nítrico inalatório em diferentes fluxos. N=08 animais/grupo.

Com relação ao número de neutrófilos, o efeito da Inalação com óxido nítrico foi ainda mais claro, sendo capaz de reduzir significativamente o número de células que migraram para a cavidade pleural, em resposta ao estímulo da carragenina (Fig. 02).



**Figura 02** – Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, após estímulo com carragenina e tratamento com óxido nítrico inalatório em diferentes fluxos. N=08 animais/grupo.

Ainda com relação ao número de neutrófilos, o efeito da Inalação com óxido nítrico em diferentes tempos foi capaz de reduzir significativamente o número de células que migraram para a cavidade pleural, em resposta ao estímulo da carragenina, sendo que o tempo de 15 minutos de inalação foi o mais efetivo. A inalação por 30 minutos a um fluxo de 10 L/min induziu uma reversão do efeito antiinflamatório, podendo significar toxicidade (Fig. 03).



**Figura 03** – Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, após estímulo com carragenina e tratamento com óxido nítrico inalatório em diferentes tempos. N=08 animais/grupo.

## Discussão

O NO endógeno está envolvido na inflamação aguda, e quando liberado pela iNOS a partir de uma estimulação imunológica, originalmente descrita em macrófagos, participa como mecanismo de defesa do hospedeiro por ter se mostrado citotóxico ou citostático para células tumorais e organismos invasivos.

O uso crescente do NO inalatório em doenças pulmonares apresenta o risco de nitosilar hemoglobina, albumina e outras moléculas plasmáticas e aumentar o estresse oxidativo local, e então, provocar um impacto na periferia (Liaudet et al., 2000).

Kubes et al (1999), demonstraram que o NO inalatório pode significativamente promover um impacto na microvasculatura periférica pós-isquêmica e ainda interromper ou reverter disfunções endoteliais e recrutamento leucocitário induzido por um episódio isquêmico.

Foram realizados protocolos com fluxos variados de NO inalatório, porém essa redução mais significativa da migração de células parece ser dependente não só do fluxo, mas também do tempo de inalação.

Embora os mecanismos pelos quais o NO induza uma redução do acúmulo de neutrófilos ainda não estejam completamente elucidados, Kubes, Suzuki e Granger (1991) demonstraram em seus resultados, que o NO pode ser um importante inibidor endógeno de adesão leucocitária em vênulas pós-capilares, pois a inativação do NO pela produção intensificada  $O_2^-$  pelas células endoteliais e/ou neutrófilos, ou a inativação da produção do NO pelos inibidores de NOS (L-NMMA e L-NAME) pôde contribuir com a aderência leucocitária.

## Conclusões

Nossos resultados demonstram claramente o efeito inibitório do óxido nítrico exógeno, administrado por via inalatória, sobre migração de leucócitos induzida por carragenina, especialmente neutrófilos. O efeito inibitório sobre a migração de células pode ser devido a inibição da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, e no próprio leucócito. Estudos adicionais se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

## Referências

- [1] - Tedgui A., Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Research*. 2001. 8(9): 877-887.
- [2] - Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Inflamação Aguda e Crônica*. In Patologia Básica. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. p21-39.
- [3] - Tonbridge HO, Emling RC. *Inflamação. Uma revisão do processo*. 4ed. São Paulo: Quintessence; 1996. 172p.
- [4] - Yoshikai Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2001. 14(3): 257 - 263.
- [5] - Al-Naemi H, Baldwin AL. Nitric oxide: role in venular permeability recovery after histamine challenge. *American Journal of Physiology (Heart Circ. Physiol.)* 1999. 46: H2010 - H2016.
- [6] - Webster NR, Galley HF. Inflammation and immunity. *British journal of Anaesthesia*. 2003. 3(2): 54 - 58.
- [7] - Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. 84(24): 9265 - 9269.
- [8] - Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988. 153(3):1251 - 1256.
- [9] - Fernandes D, Da Silva-Santos JE, Assreuy J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. *Inflammation Research*. 2002. 51: 377 - 384.
- [10] - Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa M. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema. *European Journal of Pharmacology*. 1995. 286: 219 - 222.
- [11] - Troncy E, Francoeur M, Salaskin I, Yang F, Charbonneau, M, Leclerc G, Vinay P, Blaise G. Extra-pulmonary effects of inhaled nitric oxide in swine with and without phenylephrine. *Br J Anaesth*. 1997. 79(5) 631 - 640.
- [12] - Scherrer U, Vollenweider L, Delabays A, Savcic M, Eichenberger U, Kleger GR, Fikrle A, Ballmer PE, Nicod P, Bartsch P. Inhaled nitric oxide for high-altitude pulmonary edema. *N. Engl. J. Med*. 1996. 334(10): 624 - 629.
- [13] - Inder TE, Graham PJ, Winterbourn CC, Austin NC, Darlow BA. Plasma vitamin A levels in the very low birthweight infant-relationship to respiratory outcome. *Early Hum Dev*. 1998. 52(2): 155 - 168.
- [14] - Liaudet L, Soriano FG, Scsabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*. 2000. 28(4): N37 - N52.
- [15] - Kubes P, Payne D, Grisham MB, Jourdeuil D, Fox-Robichaud A. Inhaled NO impacts vascular but not extravascular compartments in postischemic peripheral organs. *American Journal of Physiology (Heart Circ. Physiol.)*1999. 46: H676 - H682.
- [16] - Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991. 88: 4651 - 4655.