

**Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**EFEITO DA TERAPIA COM ÓXIDO NÍTRICO INALATÓRIO SOBRE  
O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM  
CAMUNDONGOS**

**Carly de Faria Coelho**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, como complementação dos créditos  
necessários para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas

São José dos Campos  
2004

**Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**EFEITO DA TERAPIA COM ÓXIDO NÍTRICO INALATÓRIO SOBRE  
O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM  
CAMUNDONGOS**

**Carly de Faria Coelho**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

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

São José dos Campos  
2004

C615e

Coelho, Carly de Faria

Efeito da terapia com óxido nítrico inalatório sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos / Carly de Faria Coelho. São José dos Campos: UniVap, 2004.

77p.: il.; 31cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1. Inflamação 2. Óxido nítrico 3. Carragenina I. Martins, Rodrigo A B Lopes, Orient. II. Título

CDU: 616-002

Autorizo para fins acadêmicos e científicos a cópia total ou parcial desta Dissertação por fotocópia ou meio eletrônico.

Aluno:

Data:

Dedico este trabalho a meu Noivo **Fabiano** e a minhas amigas **Patrícia, Karina, Malú** e **Lucia** que sempre estão presentes e me dando apoio.

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade”.

(Paulo Coelho)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que auxiliaram na concretização de um dos meus sonhos – o Mestrado;

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins por ter acreditado em mim, por ter lutado por mim, por ter me ensinado e com isso ter me oferecido uma oportunidade ímpar de continuar os meus estudos;

Agradeço a querida amiga Patrícia Sardinha Leonardo Lopes Martins por ter sido companheira, por ter tido paciência e me auxiliado muito, principalmente no início, ensinado-me a viver no mundo real da pesquisa;

Agradeço ao meu noivo, Fabiano, pela paciência, pelo apoio na minha decisão de continuar meus estudos e pelo carinho e conforto nas horas difíceis;

Agradeço meus Pais, por me incentivarem e me manterem, principalmente financeiramente, nessa fase de transição da minha vida;

Agradeço a Marinete pelos cuidados e carinho com as minhas coisas em casa;

Agradeço ao colega Rodrigo Labat por ter sido sempre solícito em ensinar as técnicas necessárias para o meu trabalho;

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Muscará e a Prof. Dra. Simone Teixeira pelo auxílio na complementação da dissertação e pela realização dos ensaios de mieloperoxidase;

Agradeço ao Prof. Dr. Wellington Ribeiro por ter cedido o laboratório de sua responsabilidade para que eu pudesse realizar a técnica histológica necessária para a minha pesquisa;

Agradeço ao Prof. Dr. Newton S. Da Silva e a Prof. Dra. Cristina P. Soares por autorizarem o uso do microscópio para realização das fotomicrografias;

Agradeço ao colega Gustavo Neves Teixeira por ter me ensinado e auxiliado nas técnicas histológicas;

Agradeço a colega Andréa Dellú por ter me auxiliado na manipulação do pletismógrafo e em alguns procedimentos do meu trabalho;

Agradeço aos queridos colegas Luciano Ramos (Superman), Luiz Gustavo Pinelli (gordinho) e Luciana Steinle por também terem sido companheiros e terem me auxiliado;

Agradeço as alunas de iniciação científica, do curso de Biologia, Catarina, Fernanda Niemann e Tatiana dos Santos que me auxiliaram em alguns procedimentos do meu trabalho e em especial a Adriana Prado, que com vontade de aprender, foi companheira e me auxiliou muito em boa parte da trajetória da minha pesquisa;

Agradeço as colegas Rafaela França e Karina Bortolin por me auxiliarem na realização das fotomicrografias e por me socorrerem em um pequeno acidente de trabalho;

Agradeço as meninas estagiárias, Naiara Coelho e Paloma Silva pela boa vontade que tiveram em me auxiliar na rotina laboratorial e também na minha pesquisa;

Agradeço aos meninos da portaria Anderson, Juliano e Wagner pela disposição em ajudar;

Agradeço a D. Ivone e a Rebeca da biblioteca pela atenção que sempre disponibilizaram;

Agradeço as funcionárias da limpeza por manterem meu ambiente de trabalho sempre limpo e em condições adequadas para execução dos meus experimentos;

Enfim, agradeço a todos que de coração torceram e rezaram para que eu concluísse esta etapa e tivesse sucesso.

Muito Obrigada!!!

## **RESUMO**

### **Efeito da Terapia com Óxido Nítrico Inalatório sobre o Edema de Pata Induzido por Carragenina em Camundongos**

CF Coelho<sup>\*</sup>, PSLM. Leonardo<sup>\*</sup>, S Teixeira<sup>\*\*</sup>, MN Muscará<sup>\*\*</sup>, W Ribeiro<sup>\*</sup>, JC Cogo<sup>\*</sup>, RAB Lopes-Martins<sup>\*+</sup>

<sup>\*</sup>Grupo de Pesquisas em Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos – SP – Brasil. <sup>\*\*</sup> Laboratório de Radicais Livres, Instituto de Ciências Biomédicas 1, Universidade de São Paulo – SP, Brasil.

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 no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os experimentos foram realizados em camundongos Swiss, machos, pesando entre 15 e 20g. O edema de pata foi induzido por uma injeção intra-plantar de 50  $\mu$ l de carragenina (500  $\mu$ g/pata). A inalação do NO foi realizada 30 minutos após e antes a injeção de carragenina em tempos e fluxos diferentes. O doador de óxido nítrico, Gliceril Trinitrato (GTN), também foi testado localmente 30 min. após e antes a injeção de carragenina. O desenvolvimento do edema de pata foi mensurado por um pletismógrafo. A área sob a curva do tempo vs volume foi calculada para cada protocolo através do software de Graphpad Prisma. A inalação do NO nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min 30 minutos após a injeção de carragenina significativamente inibiu o edema de pata  $50 \pm 3$ ,  $40 \pm 4$  e  $0 \pm 43.5\%$  respectivamente. Quando os animais inalaram NO durante 3, 10 ou 30 minutos em um fluxo de 5 L/min nós também pudemos observar uma inibição significativa do edema de pata  $25 \pm 4$ ,  $49 \pm 4$ ,  $48 \pm 5$  e  $0 \pm 39.5\%$  respectivamente. O doador de NO, GTN, injetado nas patas dos camundongos 30 min. após ou antes da injeção de carragenina não alteraram a formação do edema. Nossos resultados demonstraram um efeito anti-edematogênico do NO inalado no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, onde o efeito vasodilatador possivelmente parece não estar envolvido.

**Key words:** Óxido Nítrico inalatório, camundongo, edema de pata.

**Suporte Financeiro: UNIVAP**

<sup>+</sup> Autor para correspondência. Fax: +55-12-39471106. E-mail: [rlopes@univap.br](mailto:rlopes@univap.br)

## **ABSTRACT**

### **The Effect of Inhaled Nitric Oxide on the Carrageenan-induced Mice Paw Oedema**

CF Coelho<sup>\*</sup>, PSLM. Leonardo<sup>\*</sup>, S Teixeira<sup>\*\*</sup>, MN Muscará<sup>\*\*</sup>, W Ribeiro<sup>\*</sup>, JC Cogo<sup>\*</sup>,  
RAB Lopes-Martins<sup>\*+</sup>

<sup>\*</sup>Grupo de Pesquisas em Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos – SP – Brazil. <sup>\*\*</sup> Laboratório de Radicais Livres, Instituto de Ciências Biomédicas 1, Universidade de São Paulo – SP, Brazil.

Nitric oxide (NO), a gaseous molecule generated enzymatically from L-arginine was demonstrated to play a role in tissue injury in a number of inflammatory diseases. The acute inflammatory response depends on the release of chemical mediators which causes oedema formation and accumulation of polymorphonuclear neutrophils. There are controversial evidences implicating NO in the pathophysiology of inflammatory process as pro or anti-inflammatory molecule. The aim of the present study was to investigate the effect of inhaled NO on the carrageenan-induced mice paw oedema. The experiments were carried out on Male swiss mice weighing between 15 and 20g. Paw oedema was induced by the intra-plantar injection of 50  $\mu$ l of carrageenan (500  $\mu$ g/paw). The NO inhalation was performed 30 minutes after and before carrageenan injection at different times and flows. The nitric oxide donor Gliceryl Trinitrate (GTN) was also tested locally 30 min. after and before carrageenan injection. Paw oedema development was measured by plethysmometry. The area under the time vs volume curve was calculated for each protocol by the Graphpad Prisma software. The NO inhalation at the flows of 5, 10 and 20 L/min 30 minutes after carrageenan injection significant inhibited the paw oedema by  $50 \pm 3$ ,  $40 \pm 4$  and  $43 \pm 5$  % respectively. When the animals inhaled NO during 3, 10 or 30 minutes in a flow of 5 L/min we also could observe a significant inhibition of paw oedema of  $25 \pm 4$ ,  $49 \pm 4$ ,  $48 \pm 5$  and  $39 \pm 5$  % respectively. The NO donor GTN injected into the mice paw 30 min. after or before carrageenan injection did not alter the oedema formation. Our results demonstrated the anti-edematogenic effect of inhaled NO in the model of carrageenan-induced mice paw oedema, where the possible vasodilator effect seems to be not involved.

**Key words:** nitric oxide, inhaled, mice, paw oedema.

**Financial Support:** UNIVAP

<sup>+</sup> Corresponding author. Fax: +55-12-39471106. E-mail: [rlopes@univap.br](mailto:rlopes@univap.br)

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <u>1. Introdução</u> .....  | 3  |
| <u>1.1. Inflamação:</u> .....   | 3  |
| <u>1.2. Edema de Pata:</u> .....  | 8  |
| <u>1.3 - O Uso da Carragenina como Agente Flogógeno</u> .....   | 10 |
| <u>1.4 - Hidropletismógrafo:</u> .....  | 11 |
| <u>1.5 - Radicais Livres:</u> .....   | 12 |
| <u>1.6 - Óxido Nítrico</u> .....  | 13 |
| <u>1.6.1 - Síntese do Óxido Nítrico</u> .....   | 14 |
| <u>1.6.2 - Liberação de Óxido Nítrico (NO)</u> .....  | 16 |
| <u>1.6.3 - O Papel do Óxido Nítrico na Comunicação Transcelular</u> .....   | 16 |
| <u>1.6.4 - O Óxido Nítrico e a Inflamação</u> .....   | 17 |
| <u>1.6.5 - O Óxido Nítrico Inalatório e a Reação Inflamatória</u> .....   | 21 |
| <u>1.6.6. Inibidores da Síntese de Óxido Nítrico:</u> .....   | 22 |
| <u>2. Objetivos</u> .....   | 23 |
| <u>2.1. Objetivo Geral:</u> .....   | 23 |
| <u>2.2. Objetivos Específicos:</u> .....  | 23 |
| <u>3. Materiais e Métodos</u> .....   | 24 |
| <u>3.1. Animais:</u> .....  | 24 |
| <u>3.2. Procedimentos Experimentais:</u> .....  | 24 |
| <u>3.2.1. Edema de pata e tratamento com óxido nítrico (NO) inalatório:</u> .....   | 24 |
| <u>3.2.2. Protocolos:</u> .....   | 28 |
| <u>3.3. Protocolo de Eutanásia:</u> .....   | 34 |
| <u>3.4. Ensaio de Mieloperoxidase:</u> .....  | 34 |
| <u>3.5 - Análise histomorfológica:</u> .....  | 37 |
| <u>3.6. Análise Estatística:</u> .....  | 39 |
| <u>3.7. Reagentes:</u> .....  | 40 |
| <u>4 - Resultados</u> .....   | 41 |
| <u>4.1 - Efeito do tratamento prévio (30 minutos antes da injeção com carragenina) com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min</u> ..... | 41 |

|  |    |
|--|----|
| <u>4.2 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min</u> .....   | 42 |
| <u>4.3 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com o inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME 10 mg/Kg) sobre a terapia com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min</u> .....  | 47 |
| <u>4.4 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com o inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME 100 mg/Kg) sobre a terapia com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min</u> ..... | 49 |
| <u>4.5 - Efeito do pré-tratamento (30 minutos antes da injeção com carragenina) com o doador de óxido nítrico, gliceril trinitrato (GTN) sobre a edema de pata induzido por carragenina</u> .....                              | 51 |
| <u>4.6 - Efeito do pré-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com o doador de óxido nítrico, gliceril trinitrato (GTN) sobre a edema de pata induzido por carragenina</u> .....                                | 52 |
| <u>4.7 - Efeito do pós-tratamento com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min sobre o Edema de Pata induzido por Histamina</u> .....  | 53 |
| <u>4.8 - Efeito do pós-tratamento com óxido nítrico inalado no fluxos de 5 L/min em diferentes tempos de inalação sobre o Edema de Pata induzido por Carragenina</u> .....   | 54 |
| <u>4.9 - Efeito do pós-tratamento com óxido nítrico inalado no fluxos de 5 L/min em diferentes tempos de inalação sobre o Edema de Pata induzido por Histamina</u> .....   | 55 |
| <u>4.10 - Dosagem de mieloperoxidase (MPO) em patas de ratos após injeção sub-plantar de carragenina: Efeito da administração de NO por via inalatória</u> .....   | 56 |
| <u>5 - Discussão</u> .....   | 57 |
| <u>6 – Conclusão</u> .....   | 64 |
| <u>7 - Referências Bibliográficas</u> .....  | 65 |

## **1. Introdução**

### **1.1. Inflamação:**

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 do músculo liso) (TEDGUI & MALLAT, 2001), com objetivo final de eliminar do organismo, a causa inicial da lesão e suas conseqüências (KUMAR *et al*, 1994).

A inflamação pode ser aguda ou crônica, de acordo com o tempo de duração, assim como a natureza da própria resposta, tornando-se importante acrescentar que há, em parte, uma sobreposição entre as inflamações agudas e crônicas (TROWBRIDGE & EMLING, 1996).

Quando a reação inflamatória aguda permanece por mais alguns dias, a inflamação crônica se desenvolve, apresentando como principal característica uma resposta proliferativa, caracterizada pelo aumento do número de fibroblastos e células endoteliais, assim como a afluência de células predominantes da inflamação crônica, como por exemplo, os macrófagos (TROWBRIDGE & EMLING, 1996).

Muitos dos agentes flogísticos são detectados e destruídos em poucas horas após a entrada no hospedeiro pelo mecanismo de defesa da inflamação aguda, conhecido como imunidade inata (YOSHIKAI, 2001).

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

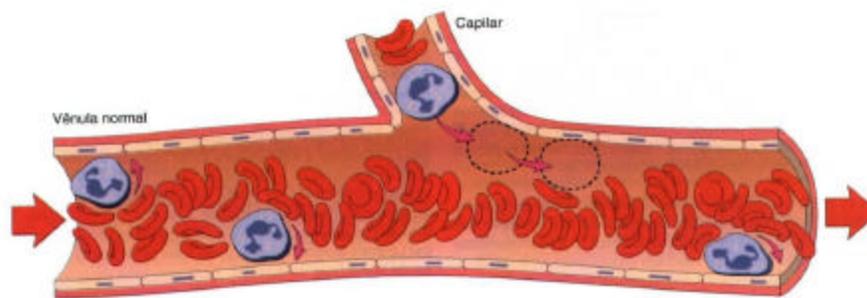
lentificação do fluxo sanguíneo local sinalizando calor e rubor; (2) permeabilidade vascular aumentada, ambos eventos, conduzindo ao extravasamento de proteínas, assim como o recrutamento de leucócitos para o espaço extravascular e subsequente formação de edema (ou tumor) e (3) a liberação de uma variedade de materiais pró-inflamatórios que provocam dor (AL-NAEMI & BALDWIN, 1999; YOSHIKAI, 2001; WEBSTER & GALLEY, 2003).

Esses eventos são responsáveis pelo reconhecimento do local da lesão através das células inflamatórias, com recrutamento específico de subpopulações de leucócitos, predominantemente polimorfonucleares (PMNs) nas primeiras 12 horas (YOSHIKAI, 2001), com posterior remoção do agente ofensor e debridamento de células e tecidos danificados, além de reparo e restabelecimento normal do sítio inflamatório (KEANE & STRIETER, 2000).

Por muitos anos, tem sido elucidado, que a adesão dos leucócitos polimorfonucleares no endotélio é um passo demarcado para o início e manutenção de uma resposta inflamatória aguda, onde há um número de fatores que governam a interação adesiva entre os leucócitos e as células endoteliais nas vênulas pós-capilares (KUBES *et al*, 1991).

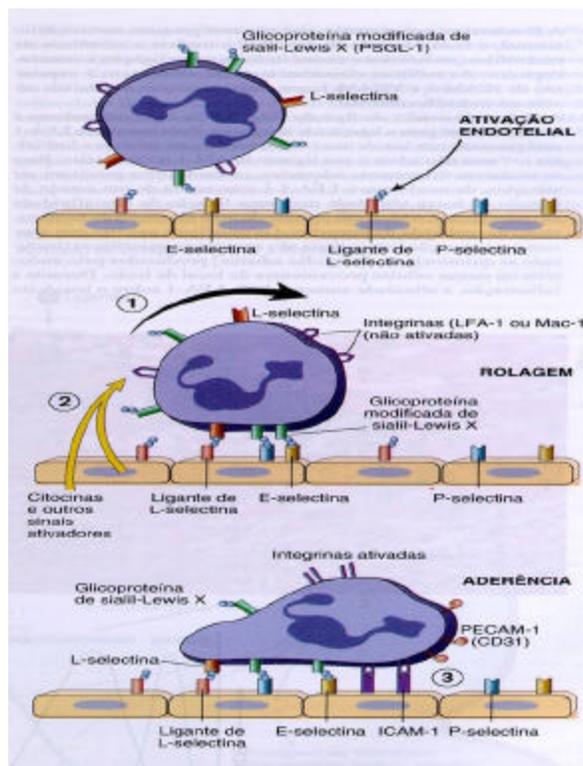
O processo de adesão pode ser dividido em três etapas:

1 - O leucócito circulante se aproxima da parede do vaso e rola sobre o endotélio (“rolling”);



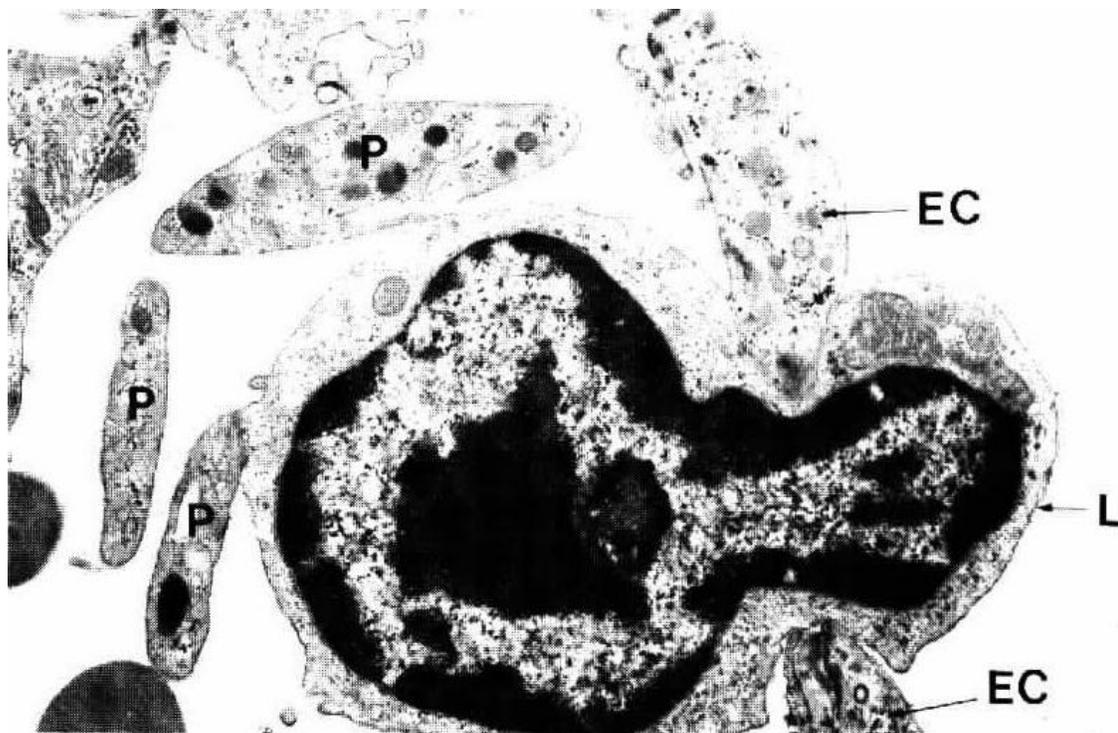
**Figura 1:** Lentificação do fluxo sanguíneo com aproximação dos leucócitos na parede vascular e “rolling”. Figura retirada de Cotran *et al* (1996).

2 – O leucócito em contato com o vaso sofre ação de substâncias solúveis liberadas no local (quimiocinas) e passa a expressar moléculas que irão determinar uma ligação mais intensa à superfície endotelial;



**Figura 2:** Expressão de moléculas de adesão, tanto no endotélio quanto no leucócito, a partir de substâncias ativadoras liberadas no sítio inflamatório. Figura retirada de Cotran *et al* (1996).

3 - Só então o leucócito é capaz de migrar através do vaso em direção ao sítio inflamatório (SPADAFORA-FERREIRA *et al*, 1996).



**Figura 3:** Microfotografia eletrônica de uma migração leucocitária por entre duas células endoteliais. Plaquetas (P), Células endoteliais (EC) e Leucócito (L). Figura retirada de Lewis (1986).

Kubes *et al* (1991) citam ainda que, para que esse processo de adesão ocorra são necessárias forças hidrodinâmicas de dispersão (como a força de cisalhamento na parede do vaso) que tendem a impulsionar os neutrófilos para a parede do vaso, e interação de cargas eletrostáticas entre os dois tipos de células.

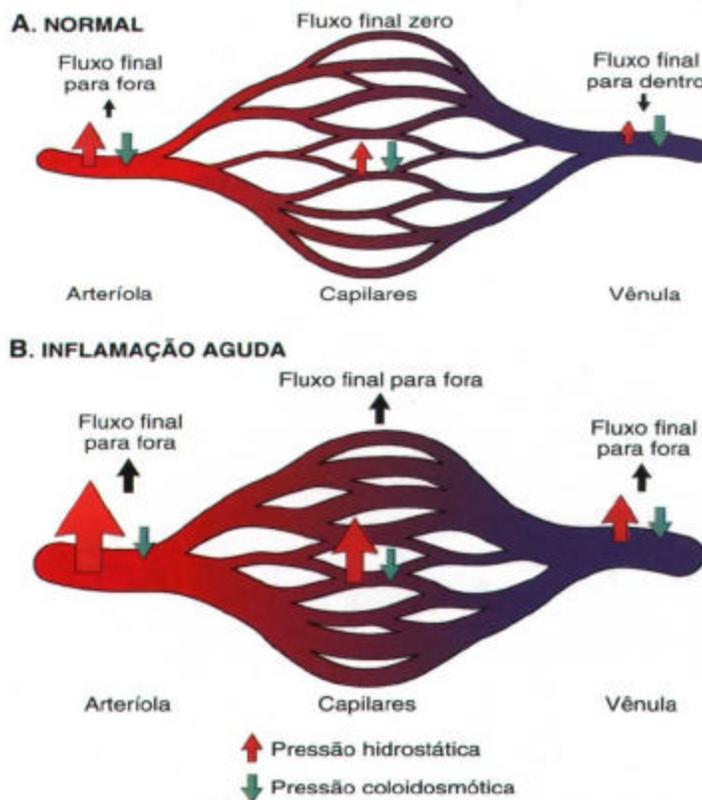
A resposta inflamatória deve ser bem ordenada e controlada. Para que isto ocorra, são necessários mediadores humorais e celulares como:

- Citocinas:
  - Interleucinas;
  - Interferons;
  - Fator de necrose tumoral;
- Proteases plasmáticas:
  - sistema calicreína-cinina,
  - sistema complemento,
  - sistema coagulação-fibrinolítico;
- Metabólitos do ácido araquidônico:
  - prostaglandinas e tromboxanos (via ciclooxigenase),
  - leucotrienos (via lipoxigenase)
  - radicais livres (isoprostatanos)
- Fator de ativação plaquetária (PAF);
- Aminas vasoativas:
  - histamina,
  - serotonina,
- Neuropeptídeos;
  - substância P,
- Óxido nítrico.

Esses mediadores são liberados com o propósito de controlar o acúmulo e ativação tardia de outras células e estão envolvidos na amplificação e propagação de ambas as inflamações aguda e crônica (KUMAR *et al*, 1994; FOEGH & RAMWELL, 2003; WEBSTER & GALLEY, 2003).

## **1.2. Edema de Pata:**

O movimento do fluído dentro e fora da microcirculação é regulado pelo equilíbrio entre a pressão hidrostática intravascular, que tende a forçar a saída do fluído dos vasos, e pelo efeito oposto da pressão osmótica exercida pelas proteínas plasmáticas, que tendem a reter o fluído dentro dos vasos - fenômeno conhecido como lei de Starling (TROWBRIDGE & EMLING, 1996). Porém, durante a resposta inflamatória aguda ocorre aumento da pressão hidrostática na microcirculação e passagem de 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 fluído para o interstício, originando o edema e aumentando a viscosidade sangüínea que tende a desacelerar o fluxo (estase sangüínea). Essa estase sanguínea favorece a adesão leucocitária, formando, assim, o exsudato inflamatório, que é a principal característica da resposta inflamatória aguda (TROWBRIDGE & EMLING, 1996; MICHEL & CURRY, 1999).



**Figura 4:** Comparação entre a microcirculação em um estado de normalidade, em equilíbrio, e a microcirculação na inflamação aguda, com vasodilatação em arteríolas e vênulas. Figura retirada de Cotran *et al* (1996).

Baseado nesse mecanismo de formação de edema, Winter *et al* (1962) introduziram a carragenina, um mucopolissacarídeo derivado da alga marinha *Chondrus*, que age como agente flogístico, no modelo de edema de pata, apresentando um pico de desenvolvimento de edema dentro das primeiras 3 a 4 horas.

### **1.3 - O Uso da Carragenina como Agente Flogógeno**

Durante a década de 60, do século XX, 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, um 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 Kappa (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 e colaboradores (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 (1 - 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 *et al*, 1972; 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*, 1990). 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).

#### **1.4 - Hidropletismógrafo:**

Vários métodos para mensuração da inflamação freqüentemente são restritos ou apresentam dificuldades em seu uso (FEREDONI *et al*, 2000), porém entre esses diferentes métodos aplicados, o hidropletismógrafo, oferece uma técnica precisa e eficiente, onde a pata inflamada é introduzida em um tubo de fluidos, elevando-se assim o nível da solução. A partir desse princípio, a diferença de volume da pata pode ser comparada, permitindo analisar o desenvolvimento do edema (FERREIRA, 1979).

### **1.5 - Radicais Livres:**

Entende-se por radical livre uma espécie química, átomo ou molécula, em cujo orbital externo existe um elétron desemparelhado promovendo uma reatividade elevada (SIGNORINI & SIGNORINI, 1993).

Os radicais livres podem ser facilmente formados quando uma ligação covalente é quebrada, e um elétron de cada par dividido permanece com cada átomo – processo conhecido como fissão homolítica. A energia requerida para dissociar a ligação covalente pode ser promovida pelo calor, radiação eletromagnética, entre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

A redução univalente de oxigênio produz uma série de radicais livres que interagem com lipídios, DNA e proteínas. Essa interação degrada proteínas e promove uma quebra no cordão de DNA, além de danificar outras estruturas genômicas. Essas espécies reativas afetam lipídios, comprometendo a integridade dos ácidos graxos poliinsaturados (como os encontrados nas membranas biológicas), os quais podem afetar a homeostase ambiental celular (CLARKSON & THOMPSON, 2000).

Eles são produzidos freqüentemente pelas células como co-produtos do metabolismo (ZWART *et al*, 1999) situando-se em níveis toleráveis, o que possibilita um controle antioxidante satisfatório pelos meios disponíveis para inativá-los. Em outras situações, onde certas vias bioquímicas estão exacerbadas, a geração de tais espécies ocorre de modo expressivo, como no uso de certos fármacos, composição irregular da dieta, bem como na mediação inflamatória e na atividade fagocítica dos leucócitos (SIGNORINI & SIGNORINI, 1993).

Os radicais livres podem ser:

- Espécies reativas de oxigênio (EROs) como: oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (FRIDOVICH, 1998), radical que facilmente atravessa membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou cobre origina o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) um dos mais reativos por necessitar somente de mais um elétron para se estabilizar (ROVER JR. *et al*, 2001).

-Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e óxido nítrico (NO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

## **1.6 - Óxido Nítrico**

Em 1980, Furchgott e Zawadski demonstraram que o relaxamento induzido pela acetilcolina em preparações de artérias isoladas 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, 1983) inicialmente denominado como Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF). Após os achados iniciais, foi demonstrado que inúmeras substâncias eram capazes de induzir vasodilatação por um mecanismo ainda desconhecido, porém, dependente da integridade da camada de células endoteliais. Estas descobertas foram 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. Entretanto, nos últimos 15 anos, tem se tornado cada vez mais claro que o endotélio vascular constitui um tecido metabolicamente ativo, com funções endócrinas que incluem um largo espectro de atividades biológicas (revisto por MONCADA *et al*, 1991; TODA & OKAMURA, 2003). O endotélio é então, capaz de influenciar o tônus vascular ao nível da macro e também da microcirculação, através da secreção parácrina de mediadores vasodilatadores e vasoconstritores (FURCHGOTT, 1983; BEVAN & HENRION, 1994; KOLLER *et al*, 1989; KOLLER *et al*, 1994).

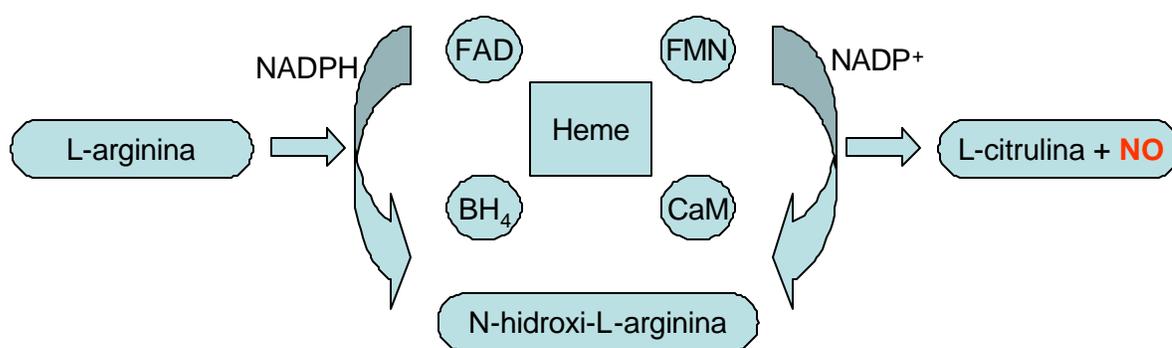
O Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio foi, mais tarde, quimicamente identificado como Óxido nítrico (NO) (PALMER *et al*, 1987; IGNARRO *et al*, 1987). Dentre os mediadores biológicos capazes de induzir liberação de EDRF (óxido nítrico), destacam-se, além da acetilcolina, a bradicinina (CHERRY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

### 1.6.1 - Síntese do Óxido Nítrico

O óxido nítrico é produzido em células de mamíferos a partir do aminoácido L-arginina e oxigênio por uma família de enzimas denominadas NO-sintases (NOS) (ALDERTON *et al*, 2001). Três isoformas são atualmente descritas: neuronal (tipo 1 ou nNOS), induzida (tipo 2 ou iNOS), e endotelial

(tipo 3 ou eNOS). A nNOS e a eNOS são dependentes de cálcio, e expressas constitutivamente, enquanto a iNOS pode ser induzida durante respostas inflamatórias e/ou imunológicas, por lipopolisacarídeos bacterianos e citocinas, tais como TNF-alfa, IL-1, IFN-gama, alfa e beta, e quimiocinas (MONCADA *et al*, 1991; KNOWLES & MONCADA, 1994; ALDERTON *et al*, 2001).

A síntese do óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina (Figura 01) pode ser inibida por análogos da própria L-arginina, como o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), de forma competitiva (IGNARRO, 1989; PALMER *et al*, 1988). A administração aguda destes agentes está associada com o aumento da pressão arterial e bradicardia (REES *et al*, 1990; GARDINER *et al*, 1990). O principal mecanismo do efeito hipertensor dos análogos da L-arginina parece resultar do bloqueio da influência vasodilatadora do NO sobre as células musculares lisas através da guanilato ciclase solúvel, que quando ativada induz o aumento intracelular do GMPc, e conseqüente relaxamento da fibra muscular.



**Figura 5:** Síntese de NO e L-citrulina por uma NOS a partir do substrato L-arginina.

### 1.6.2 - Liberação de Óxido Nítrico (NO)

O estímulo fisiológico mais importante para a liberação de óxido nítrico no sistema vascular é o aumento do “shear stress”, que pode ser traduzido como as forças de atrito ou turbilhonamento do fluxo sanguíneo sobre a parede dos vasos. Este aumento pode ser produzido pelo fluxo aumentado e/ou pela viscosidade do sangue. Entre os diversos outros estímulos capazes de induzir a liberação do óxido nítrico estão: produtos de plaquetas, trombina, hormônios, autacóides locais, neurotransmissores, modificações na tensão de oxigênio (VANHOUTTE & SHIMOKAWA, 1989).

Alguns autores têm sugerido que haja uma liberação espontânea, basal e contínua de óxido nítrico, e que a quantidade de NO liberada seja dependente do tônus vascular (GRIFFITH *et al*, 1984; RUBANY *et al*, 1985; MARTIN *et al*, 1985 A e B;). Parece ainda, que a liberação basal de óxido nítrico a partir do endotélio exerça uma inibição constante do tônus da musculatura lisa vascular subjacente, o que assume grande importância no entendimento e no tratamento da hipertensão arterial, doenças vasculares, diabetes, entre outras. Entretanto, segundo Adeagbo e colaboradores (1994) evidências indicam que seja necessário um determinado nível de vasoconstrição, para estimular esta liberação de NO.

### 1.6.3 - O Papel do Óxido Nítrico na Comunicação Transcelular

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 através de membranas

biológicas, o que lhe confere um grande poder, após sua liberação, de interagir rapidamente com a guanilato ciclase solúvel localizada em outras células próximas. Portanto, o óxido nítrico sintetizado nas células endoteliais se difunde rapidamente para as células musculares lisas subjacentes, causando relaxamento, e para o lúmen do vaso, interagindo com as plaquetas, inibindo a adesão e a agregação destas (PALMER *et al*, 1987; IGNARRO, 1989).

A meia vida do óxido nítrico em uma solução aquosa saturada de oxigênio é de 3 - 5 segundos. No entanto, em tecidos biológicos, com a produção de ânions superóxidos, ou no sangue, com sua alta capacidade de se ligar à hemoglobina, mioglobina, e outras hemoproteínas, pode diminuir bastante este tempo de meia vida. Estas características conferem ao óxido nítrico um poder de ação altamente localizado (IGNARRO, 1990).

#### 1.6.4 - 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 estabelecida: 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 (KUBES *et al*, 1992; APPLETON *et al*, 1996; FERNANDES *et al*, 2002). Se acaso desejamos investigar o possível efeito anti-inflamatório do óxido nítrico, 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 (FERNANDES *et al*, 2002).

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 ciclooxigenase 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 óxido nítrico eram capazes de reduzir o edema de pata induzido por carragenina, através da redução da atividade imunorreativa de nitrotirosina, um marcador da formação de peroxinitrito, sugerindo que a geração de óxido nítrico, ânion superóxido e peroxinitrito contribuíram para o edema observado naquele modelo. Salvemini *et al* (1996 B) também demonstraram que o óxido nítrico produzido pela NO-sintase constitutiva está envolvido no desenvolvimento da inflamação nas primeiras horas após a administração de carragenina, e que o óxido nítrico produzido pela NO-sintase induzida está envolvido na manutenção da resposta inflamatória mais tardia (6 - 12h).

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. Estes autores sugeriram que o óxido nítrico deveria exercer um papel crucial na infiltração eosinofílica em vias aéreas de ratos ativamente sensibilizados.

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 & GRANGER, 1992; IALENTI *et al*, 1992; KUBES *et al*, 1993; GIRALDELO *et al*, 1994; SALVEMINI *et al*, 1996 A e B;). Entretanto, os resultados são controversos, principalmente devido aos efeitos vasculares destes inibidores. Franco-Penteado *et al* (2001) mostraram que a permeabilidade vascular aumentada, assim como o acúmulo de neutrófilos em resposta a injeção sub-plantar de enterotoxina B de estafilococcus em camundongos foram inibidas por L-NAME e aminoguanidina, por mecanismos envolvendo a redução do fluxo sangüíneo microvascular.

O acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório resulta da interação entre leucócitos e células endoteliais (KUBES *et al*, 1991; GRANGER & 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 & LEFER, 1996; HICKEY & KUBES, 1997; HICKEY *et al*, 1997; KOSONEN *et al*, 2000; HICKEY, 2001; LELAMALI *et al*, 2001; SECCO *et al*, 2004;).

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. SECCO *et al* (2004) recentemente 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 conseqüência da diminuição da adesão e do rolamento de neutrófilos sobre o endotélio.

### 1.6.5 - 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, injúria de isquemia-reperfusão, inflamação e edema tem sido reportada (TRONCY *et al*, 1997). Scherrer *et al* (1996) reportaram que a inalação de óxido nítrico diminuiu a pressão da artéria pulmonar em indivíduos 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. Ródenas *et al* (1998) sugeriram um papel protetor para o NO na inflamação, através da inativação da NADPH oxidase e consequente inibição da produção de  $O_2^-$ .

O aumento do nível de superóxido causa adesão leucocitária, que pode ser prevenida pela adição de óxido nítrico. O óxido nítrico e os ânions superóxidos parecem regular a aderência de leucócitos ao endotélio, assim como a ativação e degranulação de mastócitos. Doadores de NO bloqueiam a liberação de PAF e histamina de mastócitos ativados, enquanto os ânions

superóxidos promovem degranulação de mastócitos quando a síntese de NO é abolida (MACKENDRICK *et al*, 1993; KUBES *et al*, 1993;)

#### 1.6.6. Inibidores da Síntese de Óxido Nítrico:

Tanto as cNOS quanto a iNOS podem ser inibidas competitivamente *in vivo* e *in vitro* por certos análogos de L-arginina, não seletivos, como por exemplo N<sup>ω</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) e o N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (MONCADA *et al*, 1991). Por sua vez, a iNOS possui inibidores seletivos, como por exemplo L-iminoetil-lisina (L-NIL) e aminoguanidina (SECCO *et al*, 2004).

Esses inibidores são utilizados para avaliar os efeitos do NO na vasodilatação, na permeabilidade vascular (IALENTI *et al*, 1992) e na migração de leucócitos para o sítio inflamatório, nos vários modelos experimentais inflamatórios (SECCO *et al*, 2004).

## **2. Objetivos**

### ***2.1. Objetivo Geral:***

Analisar a ação do NO inalado, em camundongos, no modelo de edema de pata após o desafio com carragenina.

### ***2.2. Objetivos Específicos:***

- Analisar histologicamente a característica do tecido muscular da região plantar das patas esquerdas dos camundongos após o desafio local com carragenina e tratamento com NO inalado;

- Analisar a atividade neutrofílica, através do ensaio de Mieloperoxidase, nas patas esquerdas desafiadas com carragenina e após tratamento com NO inalado.

### **3. Materiais e Métodos**

#### ***3.1. Animais:***

Foram utilizados 225 camundongos da cepa Swiss, pesando entre 15 e 20g, machos, provenientes do biotério Fazenda Bentivi em São Paulo. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, ciclo claro/escuro de 12/12h com comida e água a vontade.

#### ***3.2. Procedimentos Experimentais:***

##### **3.2.1. Edema de pata e tratamento com óxido nítrico (NO) inalatório:**

O edema de pata foi induzido com um volume máximo de 50µl/pata da solução de carragenina (500µg) ou histamina (1µmol), injetado na região plantar da pata posterior esquerda.

O volume das patas esquerdas foi mensurado através de um hidropletismógrafo (modelo 7140, Ugo Basile™, Itália).



**Figura 6** - fotografia digital ilustrando o equipamento utilizado para avaliação do volume plantar da pata de camundongos, utilizado nos protocolos experimentais deste trabalho.

Foi realizada, antes de qualquer procedimento invasivo, uma medição inicial (MI) das patas esquerdas de todos os animais dos protocolos efetuados, que serviram como controle. Após o desafio com carragenina ou histamina, foram realizadas as medidas dos volumes das mesmas patas esquerdas, de hora em hora até a 4<sup>a</sup> hora.

Desde a medida inicial até a 4<sup>a</sup> hora, foram realizadas sempre duas medições por pata, com intuito de se calcular uma média dos valores de cada pata e, com isso, uma média geral de cada hora. Desse modo, foi possível

encontrar o valor real do volume da pata da 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> hora com relação à medida inicial que correspondeu à pata normal, subtraindo a média geral de cada hora à média da medida inicial.



**Figura 7** - Fotografia digital ilustrando a realização da medição do volume da pata de camundongos utilizando o hidropletismógrafo.

A diferença de volume entre a pata antes e nas horas após o estímulo inflamatório injetado foi expressa em  $\mu\text{l}$ .

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.



**Figura 8** - Fotografia digital mostrando o sistema para inalação de óxido nítrico.

### **3.2.2. Protocolos:**

#### **Protocolo 1:**

Composto por 25 animais, divididos em 5 grupos (n=5 cada grupo).

Grupo 1: carragenina (500µg/pata) (controle);

Grupo 2: salina (controle);

Grupo 3: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/min;

Grupo 4: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 10L/min;

Grupo 5: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 20L/min.

Os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram submetidos ao tratamento com NO inalado, durante 10 minutos, nos fluxos de 5, 10 e 20L/min respectivamente, 30 minutos após a injeção de carragenina.

#### **Protocolo 2:**

Composto por 20 animais, divididos em 4 grupos (n=5 por grupo):

Grupo 1: carragenina (500µg/pata) (controle);

Grupo 2: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/min;

Grupo 3: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 10L/min;

Grupo 4: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 20L/min.

Os animais dos grupos de tratamento receberam NO inalado, por 10 minutos, também nos fluxos de 5, 10 e 20L/min, porém por 30 minutos antes das injeções de carragenina.

### **Protocolo 3:**

Foram utilizados 25 animais, divididos em 5 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: carragenina (500µg/pata) (controle);

Grupo 2: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (10mg/Kg) (controle);

Grupo 3: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (10mg/Kg) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/min;

Grupo 4: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (10mg/Kg) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 10L/min;

Grupo 5: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (10mg/Kg) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 20L/min;

Imediatamente após a injeção de carragenina o L-NAME (10mg/Kg) foi injetado, via intraperitoneal, nos animais dos grupos 2, 3, 4 e 5.

Os camundongos dos grupos 3, 4 e 5 receberam NO inalatório por 10 minutos nos fluxos de 5, 10 e 20L/min respectivamente, 30 minutos após a injeção de carragenina.

**Protocolo 4:**

Foram utilizados 25 animais, divididos em 5 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: carragenina (500µg/pata) (controle);

Grupo 2: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (100 mg/Kg) (controle);

Grupo 3: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (100 mg/Kg) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/min;

Grupo 4: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (100 mg/Kg) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 10L/min;

Grupo 5: carragenina (500µg/pata) + L-NAME (100 mg/Kg) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 20L/min;

Imediatamente após a injeção de carragenina o L-NAME (100mg/Kg) foi injetado, via intraperitoneal, nos animais dos grupos 2, 3, 4 e 5.

Os camundongos dos grupos 3, 4 e 5 receberam NO inalatório por 10 minutos nos fluxos de 5, 10 e 20L/min respectivamente, 30 minutos após a injeção de carragenina.

**Protocolo 5:**

Foram utilizados 30 animais, divididos em 6 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: carragenina (500µg/pata) (controle);

Grupo 2: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/3min;

Grupo 3: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/5min;

Grupo 4: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/10min;

Grupo 5: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/20min;

Grupo 6: carragenina (500µg/pata) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/30min de NO inalado.

Esse protocolo se difere dos demais, pois os animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 foram tratados com NO inalado, 30 minutos após a injeção de carragenina, porém somente no fluxo de 5L/min, com tempos de inalação variando entre 3, 5, 10, 20 e 30 minutos respectivamente.

#### **Protocolo 6:**

Foram utilizados 25 animais, divididos em 5 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: Carragenina (500µg/pata) ;

Grupo 2: solução 2 de GTN (10 nmoles);

Grupo 3: Carragenina (500µg/pata) + tratamento com solução 1 de GTN (03 nmoles)

Grupo 4: Carragenina (500µg/pata) + tratamento com solução 2 de GTN (10 nmoles);

Grupo 5: Carragenina (500µg/pata) + tratamento com solução 3 de GTN (30 nmoles);

Os animais dos grupos 2, 3, 4 e 5 desse protocolo receberam GTN na região intraplantar, porém os animais dos grupos 3, 4 e 5 receberam esse doador de NO, 30 minutos após a injeção de carragenina.

**Protocolo 7:**

Foram utilizados 25 animais, divididos em 5 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: Carragenina (500 $\mu$ g/pata);

Grupo 2: solução 2 de GTN (10 nmoles);

Grupo 3: Carragenina (500 $\mu$ g/pata) + tratamento com solução 1 de GTN (03 nmoles);

Grupo 4: Carragenina (500 $\mu$ g/pata) + tratamento com solução 2 de GTN (10 nmoles);

Grupo 5: Carragenina (500 $\mu$ g/pata) + tratamento com solução 3 de GTN (30 nmoles);

Os animais dos grupos 2, 3, 4 e 5 desse protocolo receberam GTN na região intraplantar, porém os animais dos grupos 3, 4 e 5 receberam esse doador de NO 30 minutos antes da injeção de carragenina.

**Protocolo 8:**

Foram utilizados 25 animais, os quais foram divididos em 5 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: histamina (1 $\mu$ mol) (controle);

Grupo 2: histamina (1 $\mu$ mol) + Cloridrato de Prometazina (4mg/Kg)

Grupo 3: histamina (1 $\mu$ mol) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/min;

Grupo 4: histamina (1 $\mu$ mol) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 10L/min;

Grupo 5: histamina (1 $\mu$ mol) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 20L/min;

Os animais do grupo 2 receberam um antagonista histamínico, o Cloridrato de Prometazina (Fenergan), via intraperitoneal, 15 minutos antes da injeção de histamina.

Os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram tratados com NO inalado, 30 minutos após a injeção de histamina nos fluxos de 5, 10 e 20L/min respectivamente, com tempo de inalação de 10 minutos.

### **Protocolo 9:**

Foram utilizados 25 animais, os quais foram divididos em 5 grupos (n = 5, por grupo):

Grupo 1: histamina (1 $\mu$ mol) (controle);

Grupo 2: histamina (1 $\mu$ mol)+ Cloridrato de Prometazina (4mg/Kg)

Grupo 3: histamina (1 $\mu$ mol) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/3min;

Grupo 4: histamina (1 $\mu$ mol) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/10min;

Grupo 5: histamina (1 $\mu$ mol) + tratamento com NO inalatório em um fluxo de 5L/30min;

Os animais do grupo 2 receberam um antagonista histamínico, o Cloridrato de Prometazina (Fenergan), via intraperitoneal, 15 minutos antes da injeção de histamina.

Os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram tratados com NO inalado, 30 minutos após a injeção de histamina somente no fluxo de 5L/min com tempo de inalação variando entre 3, 10 e 30 minutos respectivamente

Todos os animais utilizados foram sacrificados para remoção dos músculos plantares das patas esquerdas, com intuito de se realizar estudos histomorfológicos comparativos entre os diferentes protocolos e para realização do ensaio da atividade da mieloperoxidase.

### ***3.3. Protocolo de Eutanásia:***

Os animais foram anestesiados com 0,05 ml (50 µl) de Cloridrato de Xilazina (20mg/ml) mais 0,05 ml (50 µl) de Cloridrato de Ketamina (100mg/Kg), injetados via intraperitoneal.

Após o efeito anestésico os animais foram colocados em uma câmara com Halotano para realização do sacrifício.

### ***3.4. Ensaio de Mieloperoxidase:***

Esse procedimento foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP-SP), no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Muscará.

**Soluções:****- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.0:**

-Solução A: fosfato monobásico de potássio 50 mM (6.8 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

-Solução B: fosfato dibásico de potássio 50 mM (8.7 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

Adicionar solução B (aproximadamente 12ml) na solução A (aproximadamente 988 ml) até pH 6.0. Estocar em geladeira.

**- Tampão HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetil-amônio):**

5 g of HTAB para 1 litro de tampão fosfato de potássio (pH 6.0).

Aquecer cuidadosamente para a dissolução.

Estocar em geladeira e aquecer para redissolução quando necessário.

**- o-Dianisidina:**

16,7 mg de dihidrocloreto de o-dianisidina + 90 ml de água bidestilada + 10 ml de tampão fosfato de potássio (pH 6.0) + 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%).

Obs: Essa solução deve ser preparada sempre no dia da realização da atividade da Mieloperoxidase.

**Preparo das amostras:**

Foram pesados 100 - 200 mg de tecido das patas esquerdas e congelados imediatamente em gelo seco.

Após esse procedimento os tecidos foram guardados em freezer até serem processados.

No processamento, os tecidos foram homogeneizados em polytron durante 15 segundos com 1 ml de HTAB para cada 50 mg de amostra.

Após essa etapa os homogenatos foram agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga de eppendorf e, então, os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO.

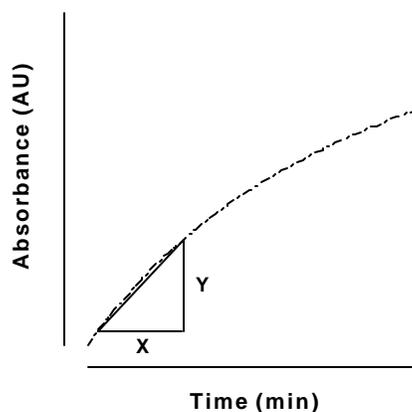
### **Análise da atividade da MPO:**

Dez microlitros de sobrenadante foram adicionados à 200  $\mu$ l de solução de dihidrocloro de o-dianisidina utilizando-se uma placa de Elisa.

Em cubetas, foram utilizados 100  $\mu$ l de amostra para 2 ml de dihidrocloro de o-dianisidina.

A medida de absorvância foi realizada a 460 nm e registrada em intervalos de 15 segundos durante 2 min.

### **Cálculo da atividade da MPO:**



Varição de absorvância/min =  $Y \text{ (AU)} / X \text{ (min)} = Z \text{ (AU/min)}$ .

1 mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  dá uma variação em absorvância = 11300 AU, no entanto,  
1  $\mu$ mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  dá uma variação em absorvância = 0.0113 AU, e 1 unidade de  
MPO = 1  $\mu$ mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado = 0.0113 AU

### **3.5 - Análise histomorfológica:**

Após a fixação do músculo plantar em formol a 10% por um período mínimo de 24 horas, foram processadas as seguintes etapas:

#### **1ª. Etapa:**

Retira-se a peça do formol a 10% e a lava em água corrente durante 15 minutos.

#### **2ª. Etapa: Desidratação**

Depois da peça lavada, a desidrata com álcool nas seguintes concentrações e tempo:

- álcool 70% por 2 horas;
- álcool 95% por 2 horas;
- álcool 100% aproximadamente 8 horas.

#### **3ª. Etapa: Diafanização**

No dia seguinte diafaniza-se com Xilol por 2 horas, troca-se o Xilol e novamente deixa-se por mais duas horas (até a peça ficar bem clara, diafanizada).

#### **4ª. Etapa: Impregnação e Inclusão**

Colocam-se as peças em um recipiente de vidro com parafina aquecida (fase líquida) na estufa à 58°C por 2 horas. Troca-se a parafina e deixa a peça permanecer por mais duas horas. Retira-se o material da estufa e

o inclui em formas adequadas contendo parafina aquecida que a temperatura ambiente resfriará a parafina a fim de constituir blocos sólidos.

### **5ª. Etapa: Realização dos cortes no Micrótomo**

- Limpam-se as lâminas a serem usadas (antes de começar a cortar);
- Acerta-se o bloco no micrótomo;
- O corte obtidos são colocados em álcool 50 % antes do banho-maria (o corte ficará esticado);
- Colocar os cortes em banho-maria (40°C);
- "Pescar" os cortes com as lâminas;
- Depois de prontas deixar as lâminas na estufa por no mínimo 4hs e no máximo 24hs.

Os cortes obtidos com 6µm de espessura cada foram semi-seriados, sendo aproveitado quatro cortes e desprezado seis cortes.

### **6ª. Etapa: Processo de Coloração: Metodologia para Hematoxilina-Eosina**

Usar uma cubeta própria para coloração, e nela colocar as lâminas com os cortes para serem corados. Acompanhar o processo com um relógio "timer" de contagem regressiva ou um relógio comum.

- 1- Xilol I – 10 minutos;
- 2- Xilol II – 1 minuto;
- 3- Álcool absoluto 100% – 1 minuto;
- 4- Álcool 95% - 1 minuto;

- 5- Álcool 70% - 1 minuto (lavar por 5 minutos com água);
- 6- Hematoxilina – 3 minutos (lavar por 5 minutos com água);
- 7- Eosina – 3 minutos;
- 8- Álcool 95% - 1 minuto;
- 9- Álcool absoluto 100% – 1 minuto;
- 10- Álcool absoluto 100% – 1 minuto;
- 11- Xilol Diafanização I – 1 minuto;
- 12- Xilol Diafanização II – 1 minuto;
- 13- Manter as lâminas imersas no Xilol até a hora da montagem.

#### **7ª. Etapa: Montagem das lâminas:**

Colocar a lâmina do corte histológico inclinada sobre a lamínula de montagem contendo uma gota de Entellan, que deve-se espalhar sobre a lamínula sem formar bolhas. Após isso, aguardar a secagem por uns dois dias e retirar o excesso de Entellan com uma gaze embebida em Xilol.

### **3.6. Análise Estatística:**

Os dados foram expressos em médias  $\pm$  E. P. M. Foram utilizados o teste não pareado t-Student e análise de variância (ANOVA) para mensurações repetidas, considerando um valor significativo  $P = 0.05$ .

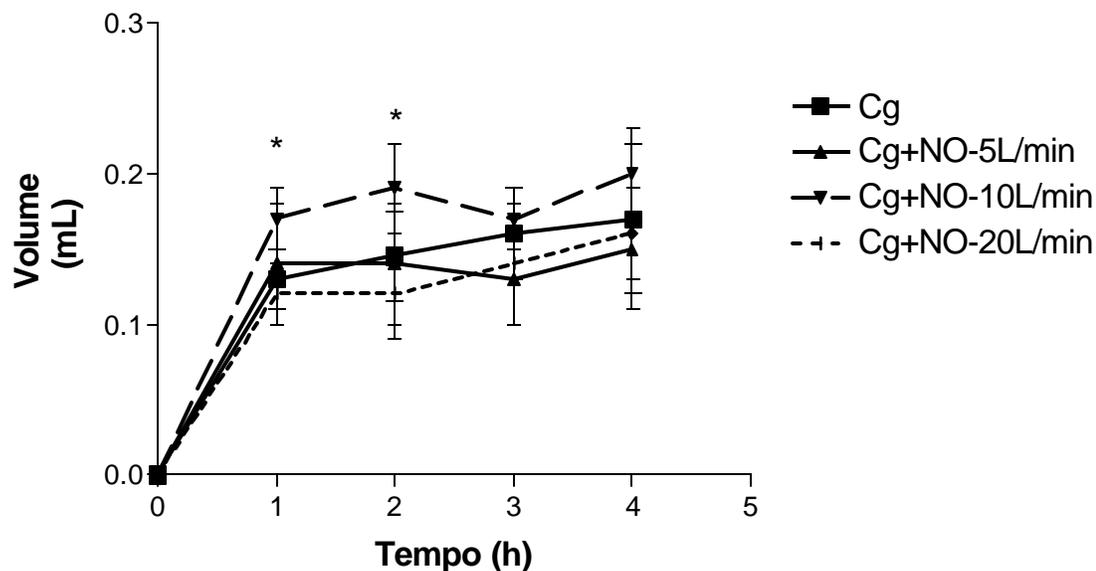
### **3.7. Reagentes:**

Os reagentes: carragenina lambda tipo IV, histamina, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster, brometo de hexadeciltrimetil-amônio e dihidroclorato de o-dianisidina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St.Louis, Mo, USA). Nitronal (Gliceril trinitrato) foi adquirido da Lipha Pharmaceuticals Limited (West Drayton Middlesex, UK). Cloridrato de Prometazina (Fenergan) foi adquirido da Rhodia Farma Ltda (São Paulo, Brasil), e o óxido nítrico da Air Liquide Brasil S.A. (Alphagaz).

## 4 - Resultados

### **4.1 - Efeito do tratamento prévio (30 minutos antes da injeção com carragenina) com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min**

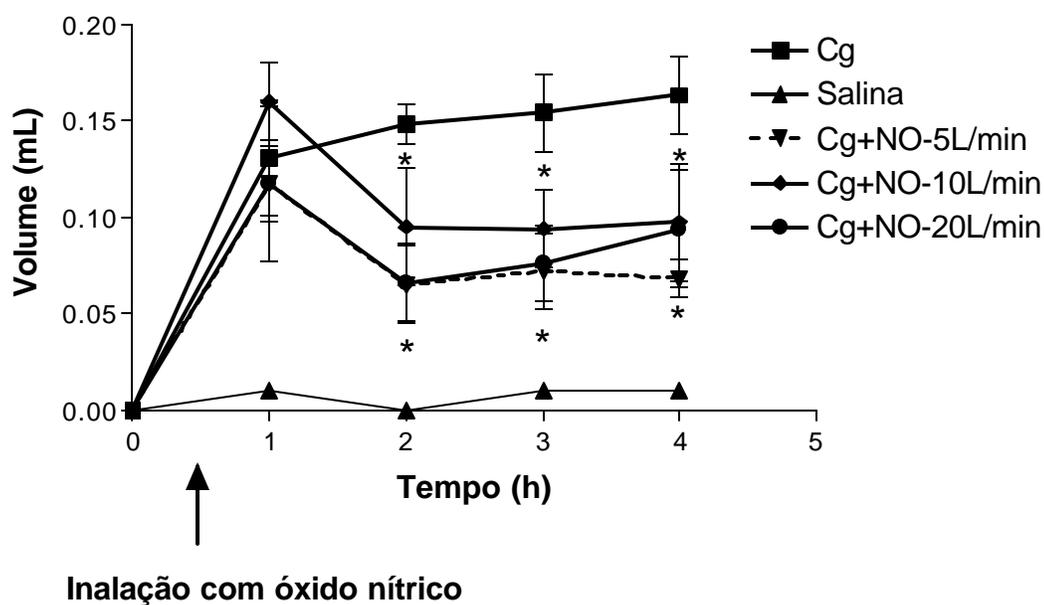
Como podemos observar no gráfico 01, o tratamento prévio com óxido nítrico inalado em três diferentes fluxos, não foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Por outro lado podemos observar uma potencialização significativa do edema no fluxo de 10 L/min, nas duas primeiras horas de observação.



**Gráfico 01** - Efeito do óxido nítrico previamente inalado (30 minutos antes da injeção de carragenina) nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

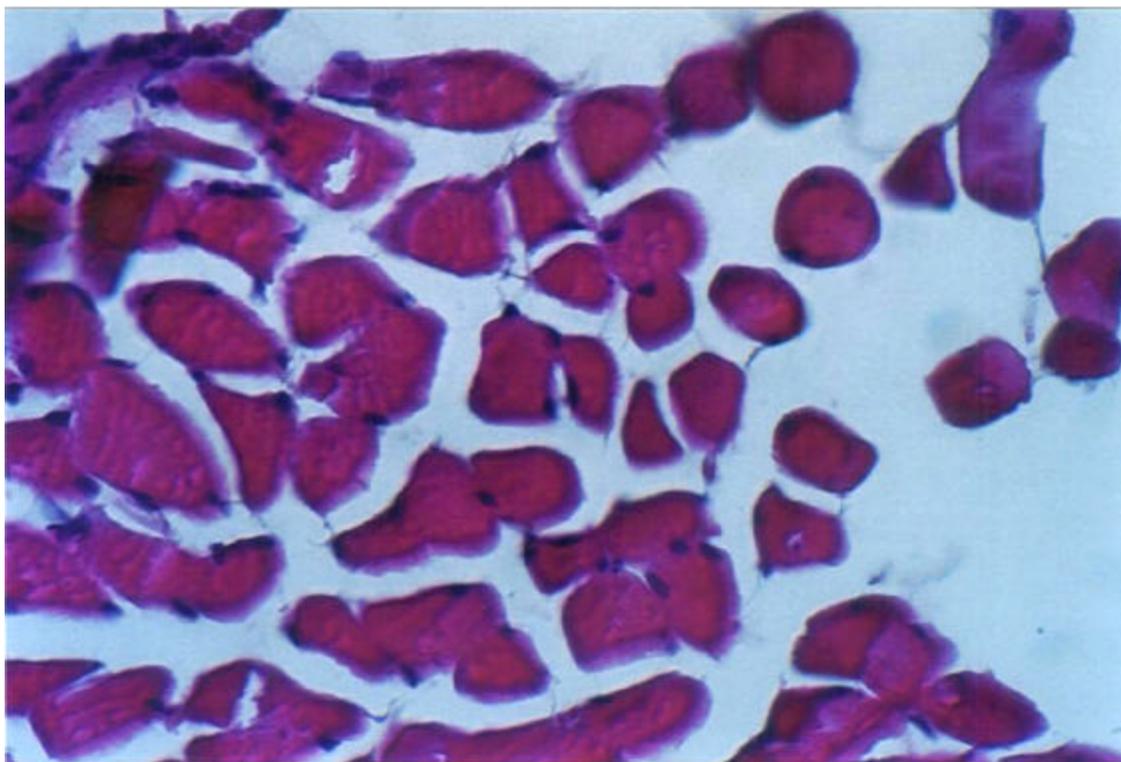
## 4.2 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min

Como podemos observar no gráfico 02, o pós-tratamento com óxido nítrico inalado em três diferentes fluxos, foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Podemos observar um efeito pronunciado de inibição do edema após a 1ª hora do experimento, demonstrando uma reversão dos valores observados nesta hora.

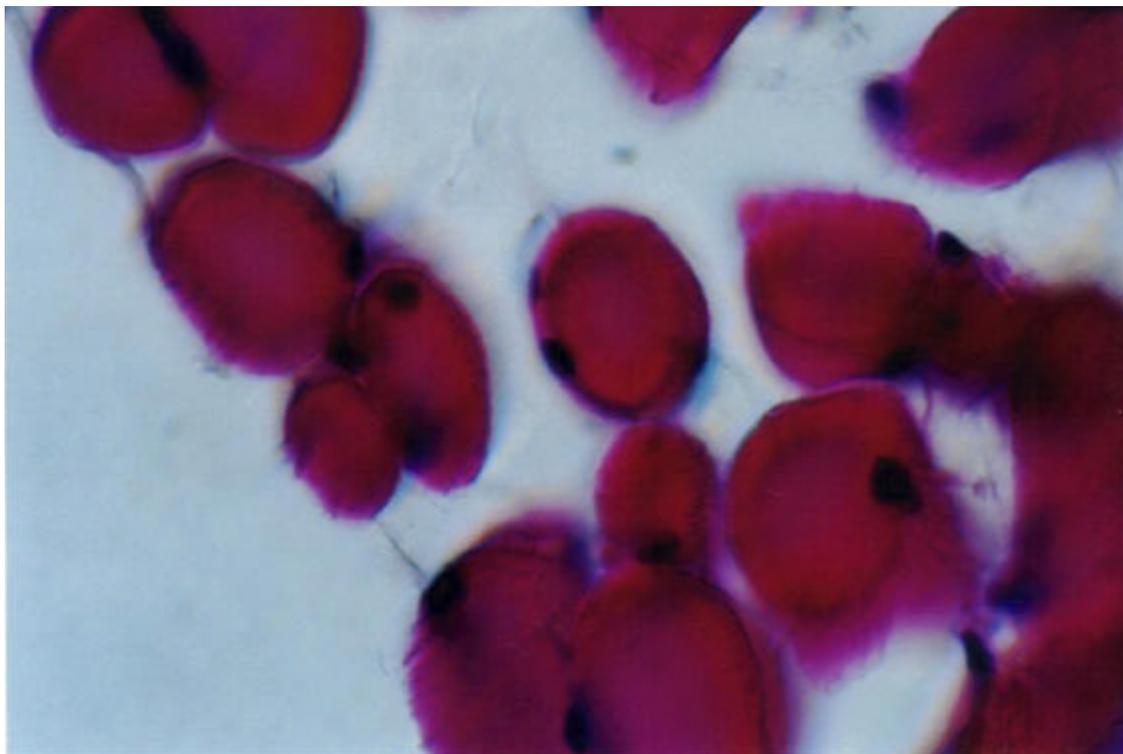


**Gráfico 02** - Efeito do óxido nítrico inalado 30 minutos após a injeção de carragenina, nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min, sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

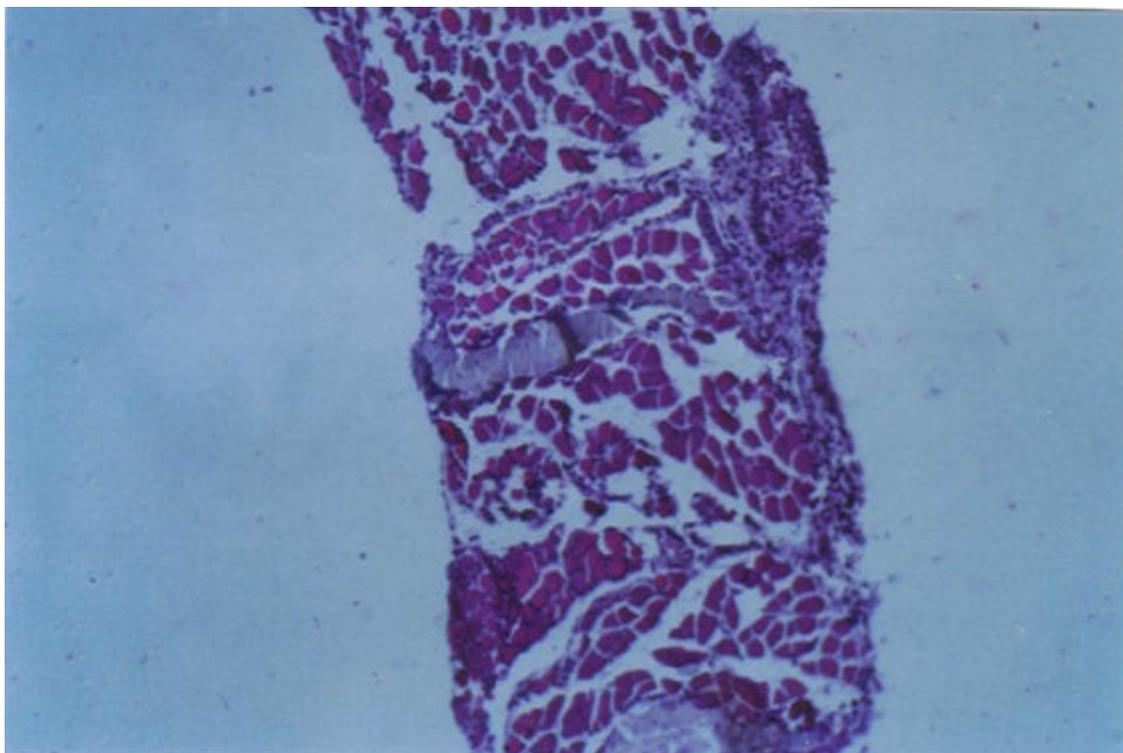
As figuras 09 e 10 demonstram as lâminas histológicas da região plantar da pata de camundongos, 4 horas após a injeção de solução salina estéril. As figuras 11, 12 e 13 mostram as lâminas histológicas do tecido plantar da pata de camundongos após 04 horas da injeção de carragenina. Podemos observar o intenso infiltrado leucocitário induzido pela carragenina. As figuras 14 e 15 mostram as lâminas histológicas do grupo tratado com óxido nítrico inalado a um fluxo de 5 L/min durante 10 minutos. A inalação do óxido nítrico foi iniciada 30 minutos após a injeção da carragenina. Podemos observar uma diminuição significativa da infiltração leucocitária no tecido plantar da pata dos camundongos.



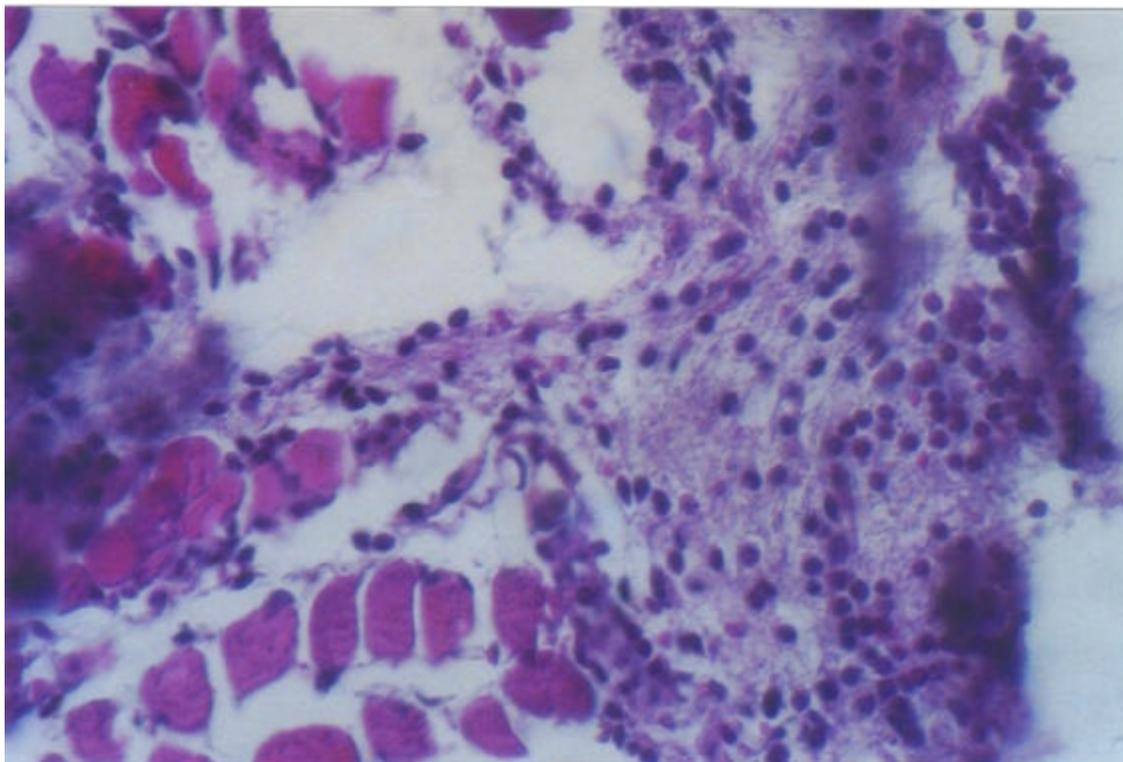
**Figura 9** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de salina. Visão panorâmica em aumento de 400 X, mostrando a ausência de células inflamatórias. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



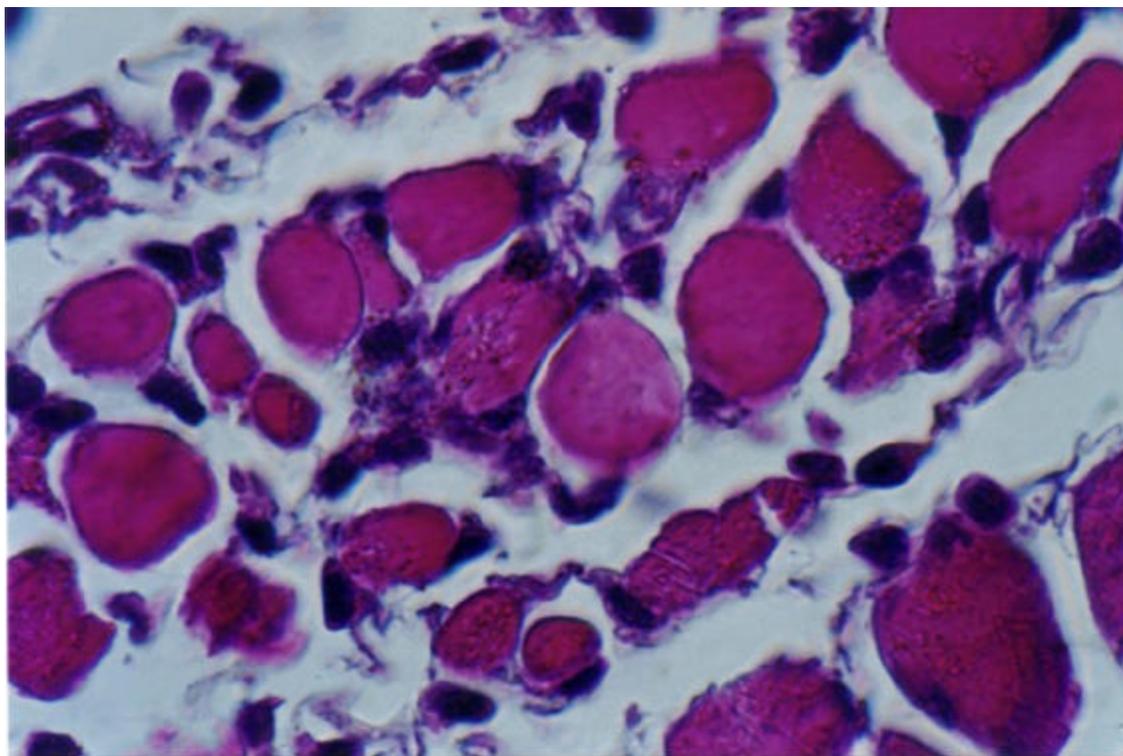
**Figura 10** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de salina. Visão em aumento de 1000 X, mostrando a ausência de células inflamatórias. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



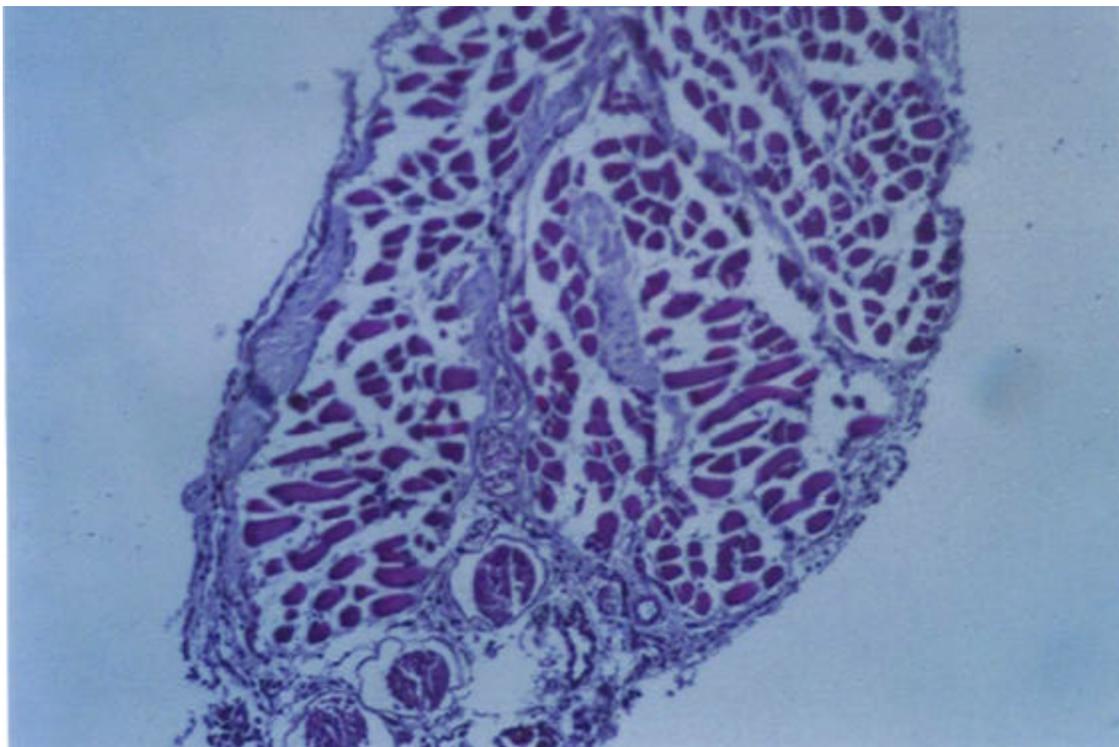
**Figura 11** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina. Visão panorâmica em aumento de 100 X, mostrando o intenso influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



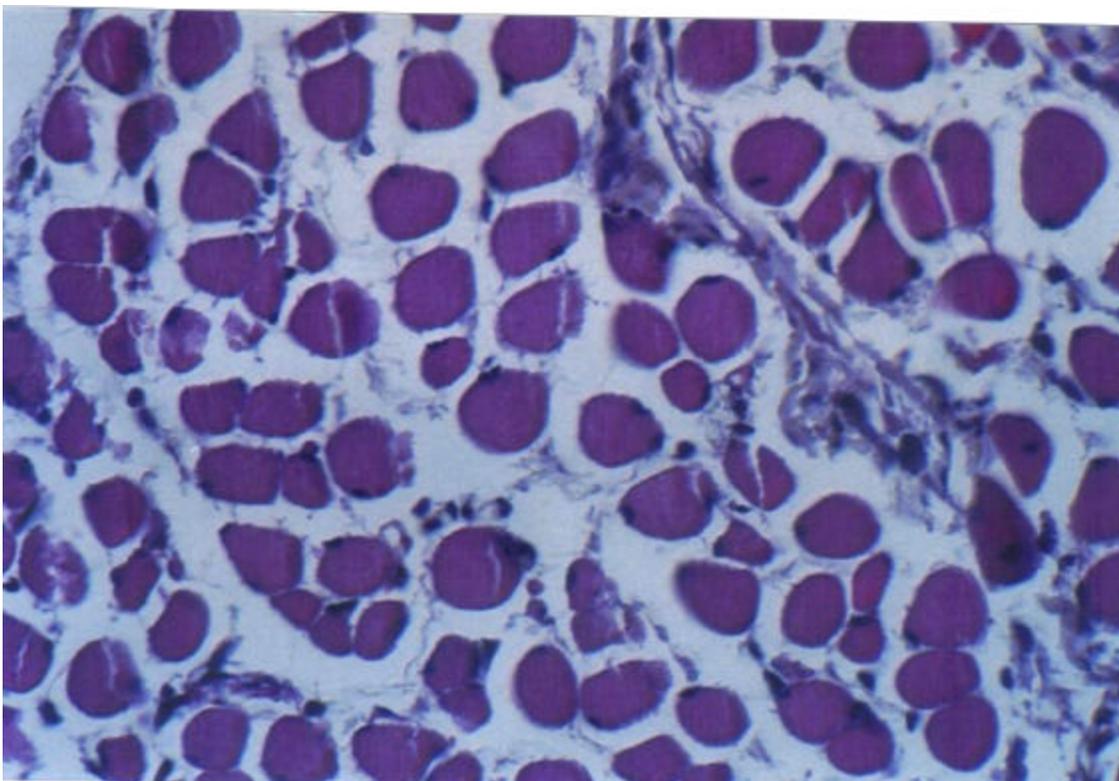
**Figura 12** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina. Visão panorâmica em aumento de 400 X, mostrando o intenso influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



**Figura 13**- Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina. Visão em aumento de 1000 X, mostrando o intenso influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



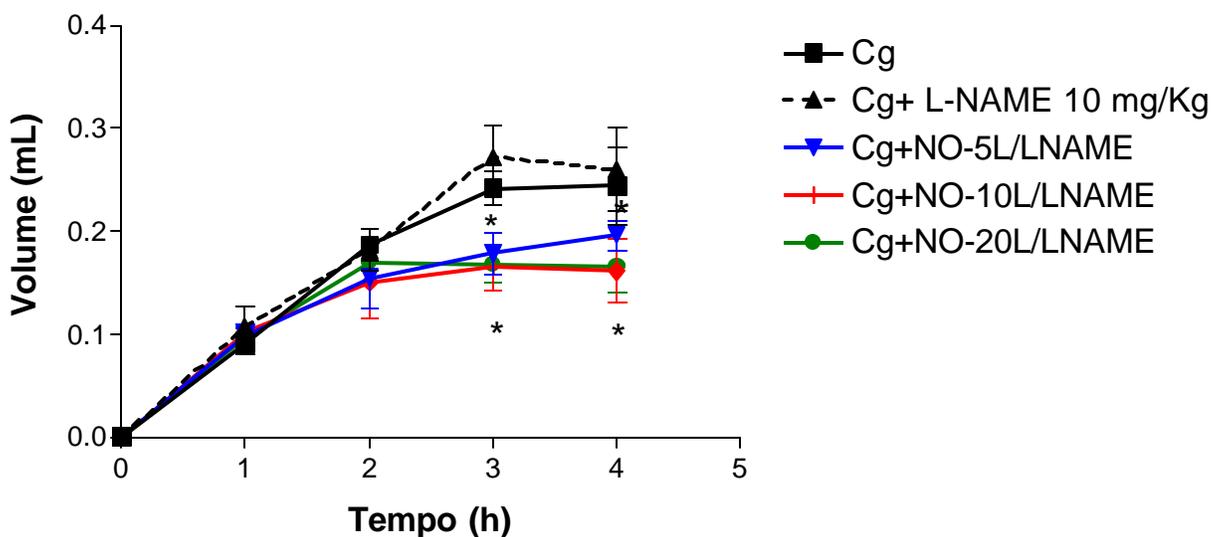
**Figura 14** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina e tratados com óxido nítrico inalatório a um fluxo de 5 L/min. Visão panorâmica em aumento de 100 X, mostrando completa inibição do influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



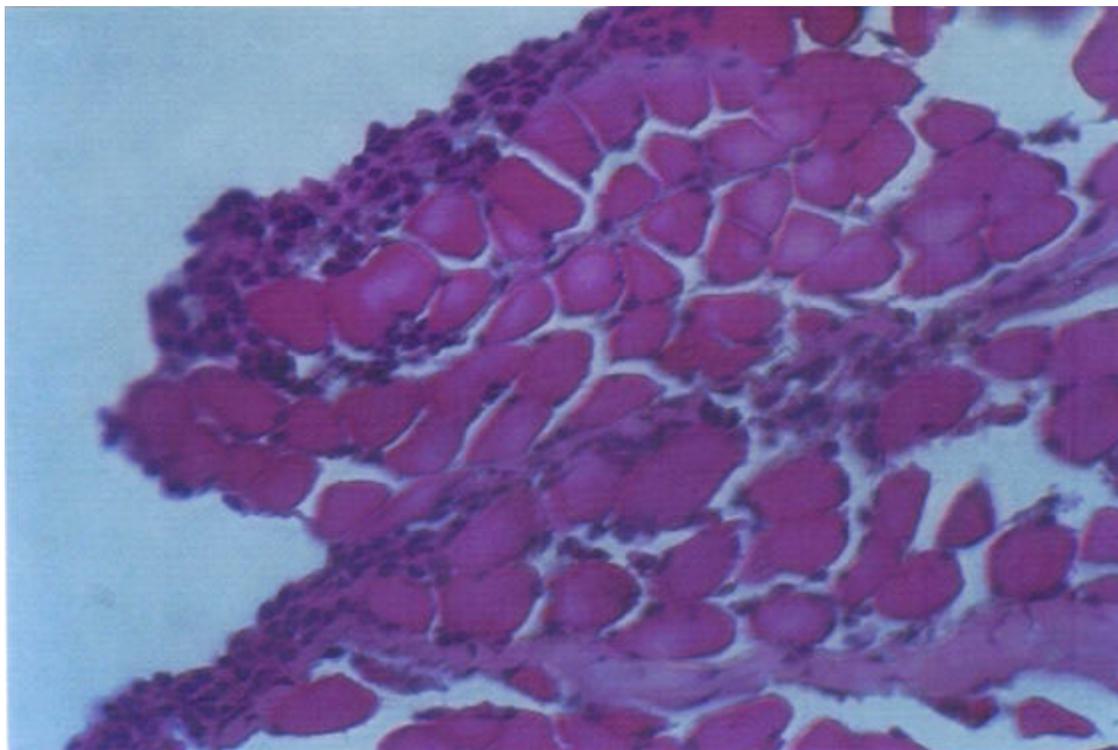
**Figura 15** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina e tratados com óxido nítrico inalatório a um fluxo de 5 L/min. Visão panorâmica em aumento de 400 X, mostrando completa inibição do influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;

### 4.3 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com o inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME 10 mg/Kg) sobre a terapia com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min

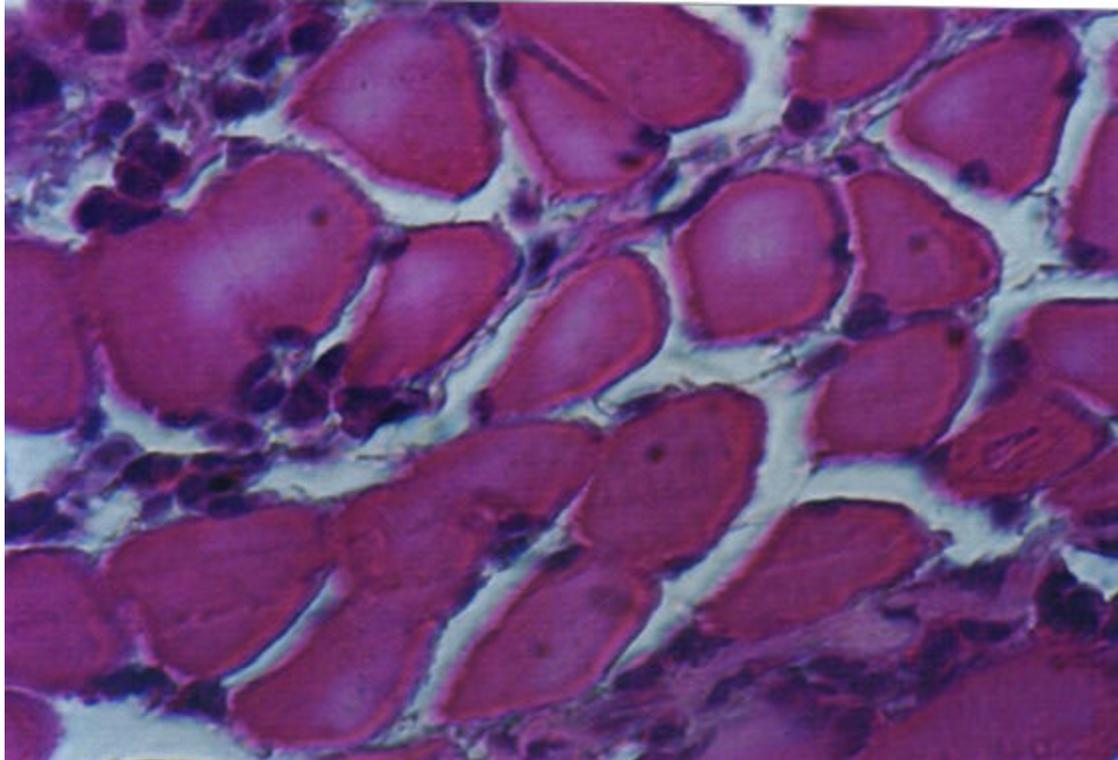
Como podemos observar no gráfico 03, o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME na dose de 10 mg/kg administrado por via intraperitoneal não foi capaz de modificar significativamente o edema de pata induzido por carragenina. Além disso, o L-NAME também não interferiu no efeito anti-edematogênico observado para o pós-tratamento com óxido nítrico inalado em três diferentes fluxos, o qual foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Nas figuras 16 e 17 podemos observar as lâminas histológicas deste experimento, demonstrando que o L-NAME na dose de 10 mg/kg também não foi capaz de inibir o influxo leucocitário induzido pela injeção de carragenina.



**Gráfico 03** - Efeito do L-NAME sobre o edema de pata induzido por carragenina e sobre a terapia com óxido nítrico inalado. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.



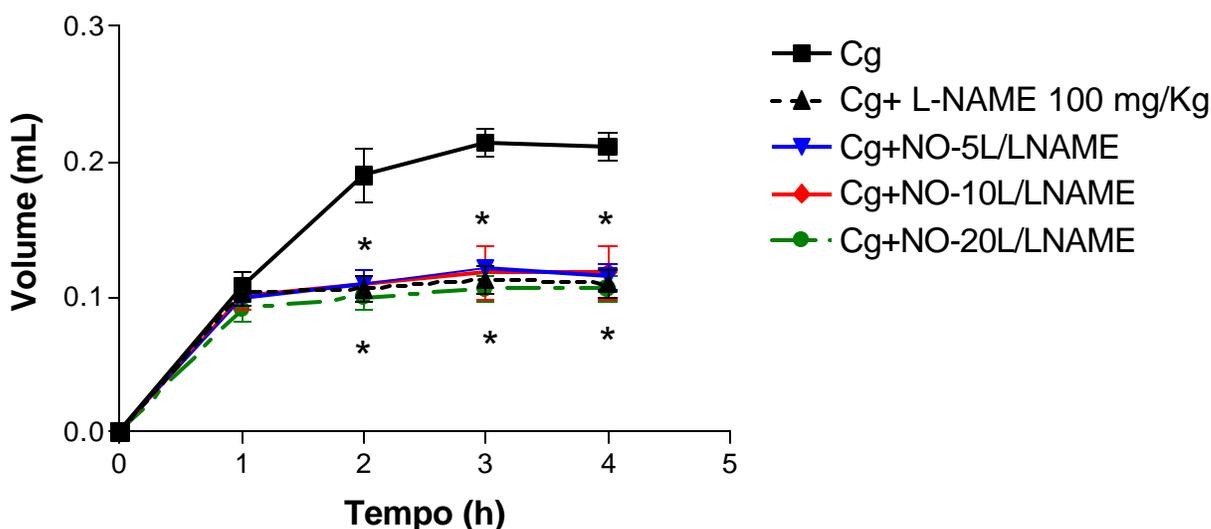
**Figura 16** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina e tratados o inibidor da síntese de óxido nítrico endógeno (L-NAME) na dose de 10 mg/Kg. Visão panorâmica em aumento de 400 X, mostrando influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



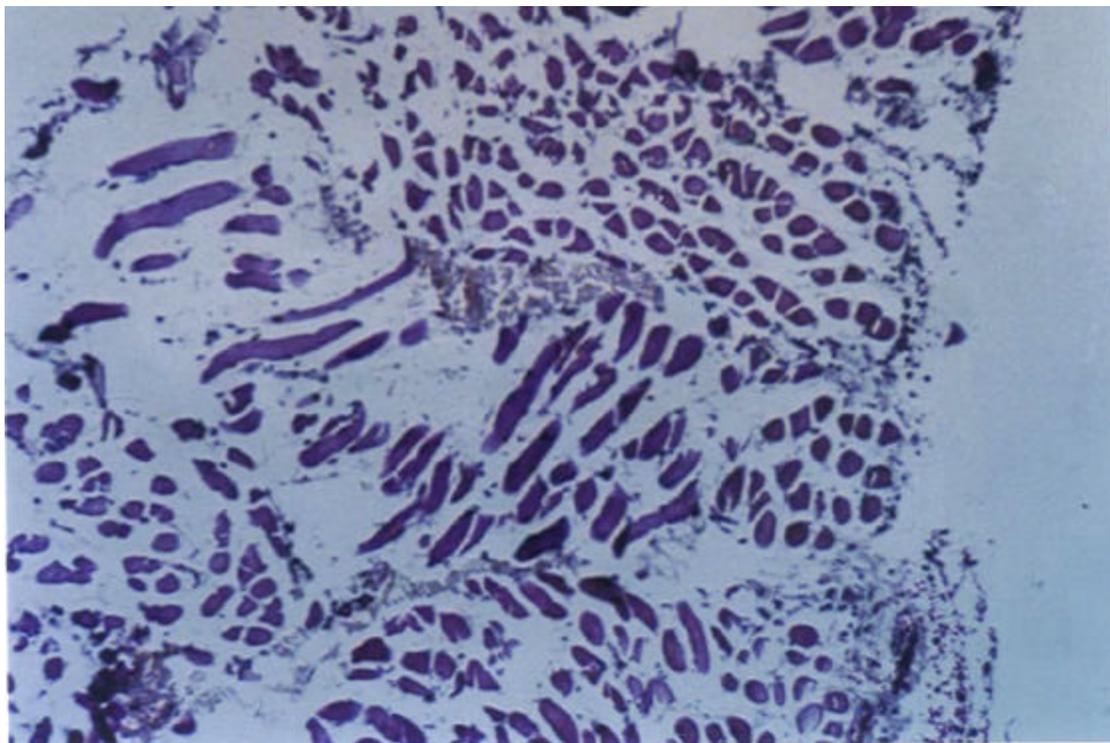
**Figura 17** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina e tratados o inibidor da síntese de óxido nítrico endógeno (L-NAME) na dose de 10 mg/Kg. Visão em aumento de 1000 X, mostrando influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;

#### 4.4 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com o inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME 100 mg/Kg) sobre a terapia com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min

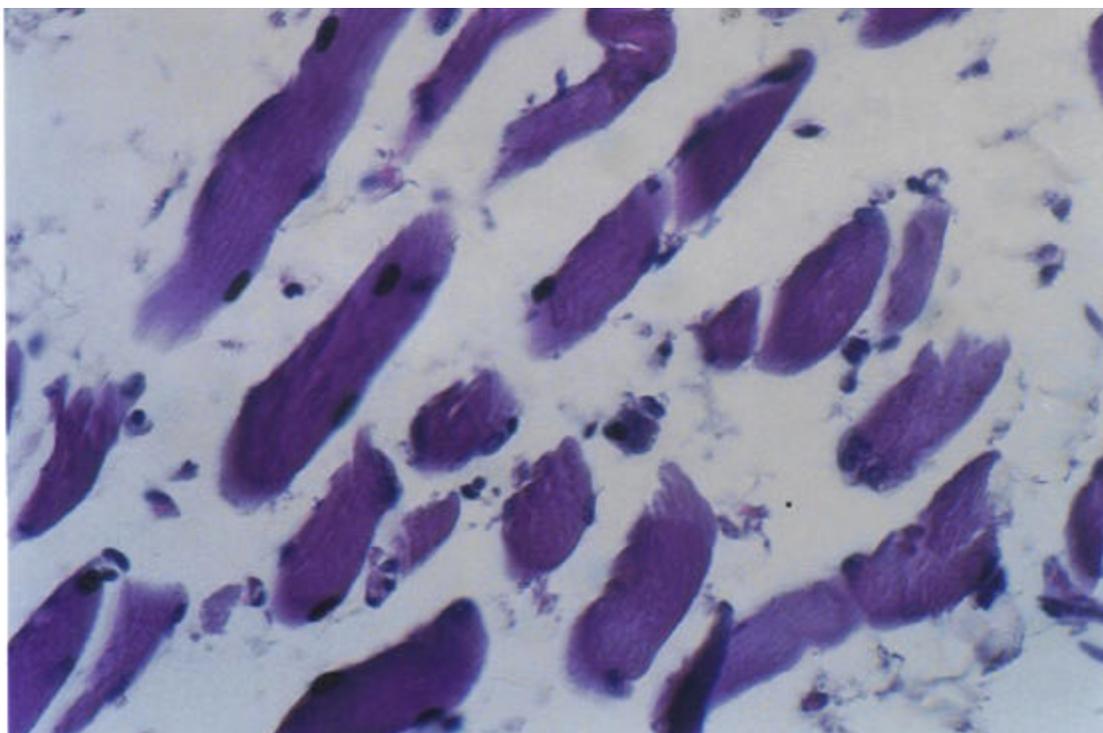
Como podemos observar no gráfico 04, o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME na dose de 100 mg/kg administrado por via intraperitoneal inibiu de maneira significativa o edema de pata induzido por carragenina. Além disso, o L-NAME também interferiu no efeito anti-edematogênico observado para o pós-tratamento com óxido nítrico inalado em três diferentes fluxos, resuzindo o edema e igualando todos os grupos tratados. Nas figuras 18 e 19 podemos observar as lâminas histológicas deste experimento, demonstrando que o L-NAME na dose de 100 mg/kg foi capaz de inibir o influxo leucocitário induzido pela injeção de carragenina.



**Gráfico 04** - Efeito do L-NAME (100 mg/Kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina e sobre a terapia com óxido nítrico inalado. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p < 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.



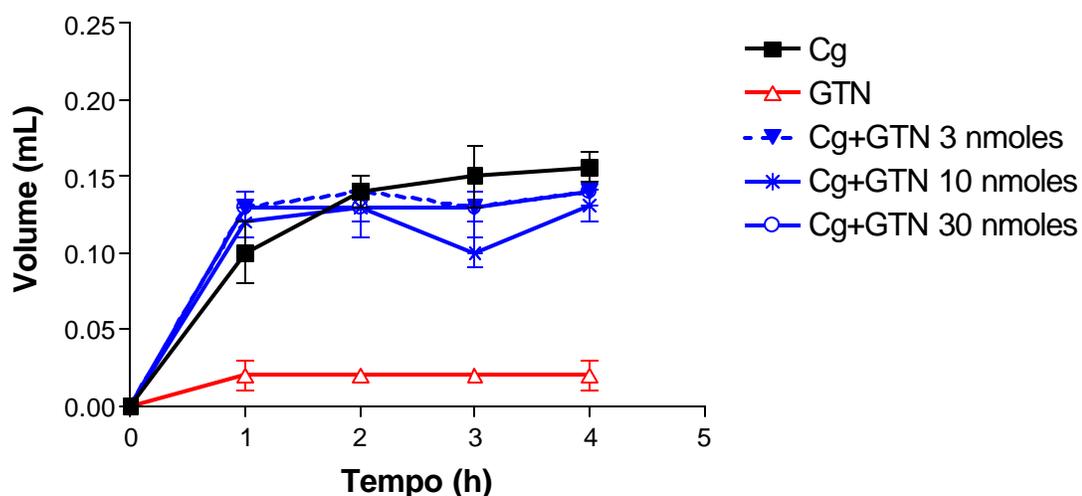
**Figura 18** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina e tratados o inibidor da síntese de óxido nítrico endógeno (L-NAME) na dose de 100 mg/Kg. Visão panorâmica em aumento de 100 X, mostrando inibição do influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;



**Figura 19** - Fotomicrografia de lâmina histológica do tecido plantar de pata de camundongos 4 h após a injeção de carragenina e tratados o inibidor da síntese de óxido nítrico endógeno (L-NAME) na dose de 100 mg/Kg. Visão panorâmica em aumento de 400 X, mostrando inibição do influxo leucocitário. Lâmina representativa de 5 animais/grupo;

#### 4.5 - Efeito do pré-tratamento (30 minutos antes da injeção com carragenina) com o doador de óxido nítrico, gliceril trinitrato (GTN) sobre a edema de pata induzido por carragenina

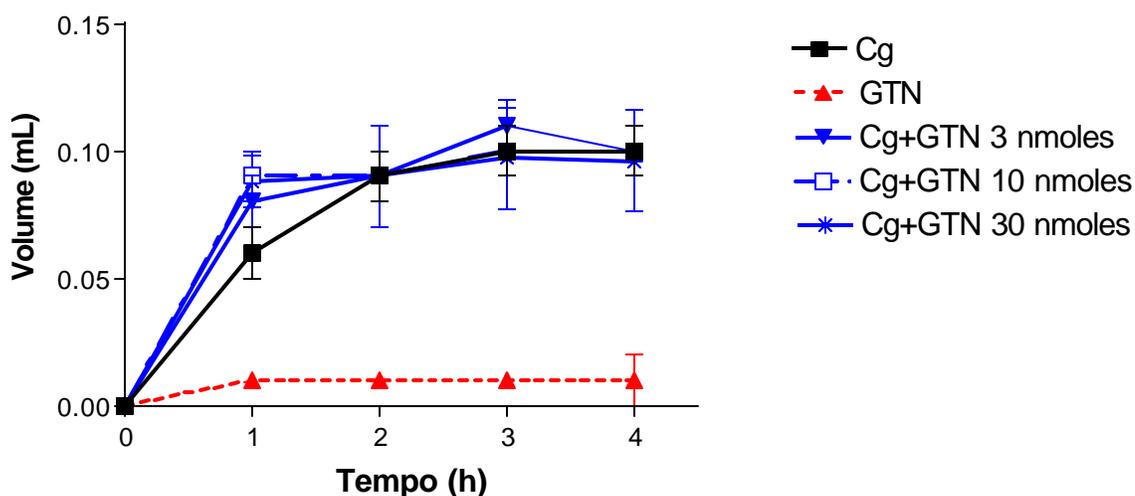
Como podemos observar no gráfico 05, o doador de óxido nítrico, GTN, administrado localmente, nas doses de 03, 10 e 30 nmoles/pata nos camundongos, 30 minutos antes da injeção de carragenina, não foi capaz de alterar significativamente o edema de pata.



**Gráfico 05** - Efeito do **pré-tratamento** (30 minutos) com o doador de óxido nítrico gliceril trinitrato (GTN) nas doses de 03, 10 e 30 nmoles/pata, sobre o edema de pata induzido por carragenina. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

#### 4.6 - Efeito do pós-tratamento (30 minutos após a injeção com carragenina) com o doador de óxido nítrico, gliceril trinitrato (GTN) sobre a edema de pata induzido por carragenina

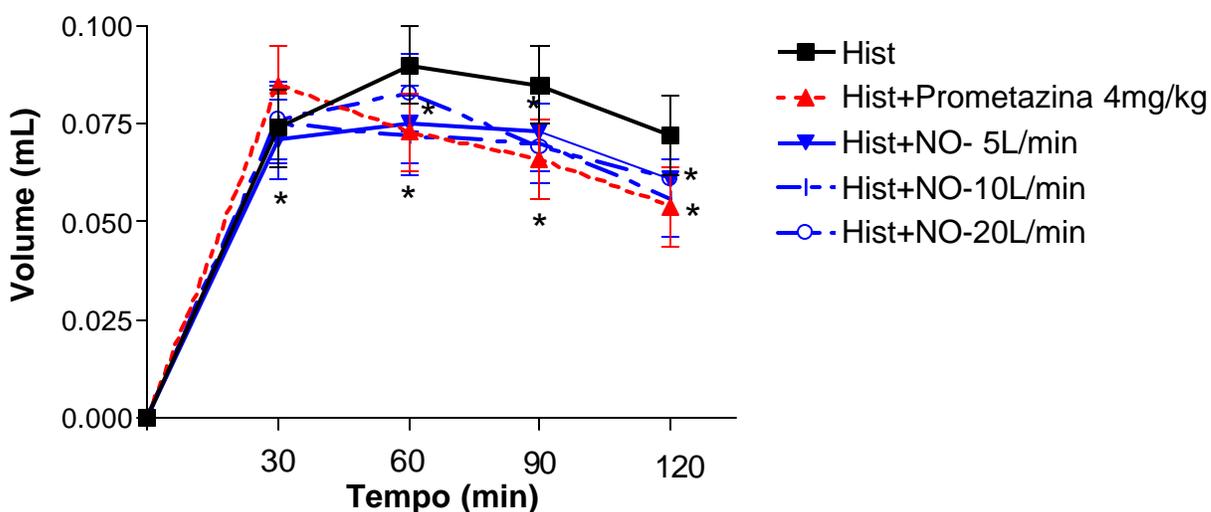
Como podemos observar no gráfico 06, o doador de óxido nítrico, GTN nas doses de 03, 10 e 30 nmoles/pata, 30 minutos após a injeção de carragenina na pata dos camundongos, não foi capaz de alterar significativamente o edema de pata .



**Gráfico 06** - Efeito do **pós-tratamento** (30 minutos após a injeção de carragenina) com o doador de óxido nítrico gliceril trinitrato (GTN) nas doses de 03, 10 e 30 nmoles/pata, sobre o edema de pata induzido por carragenina. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

#### 4.7 - Efeito do pós-tratamento com óxido nítrico inalado nos fluxos de 5, 10 e 20 L/min sobre o Edema de Pata induzido por Histamina.

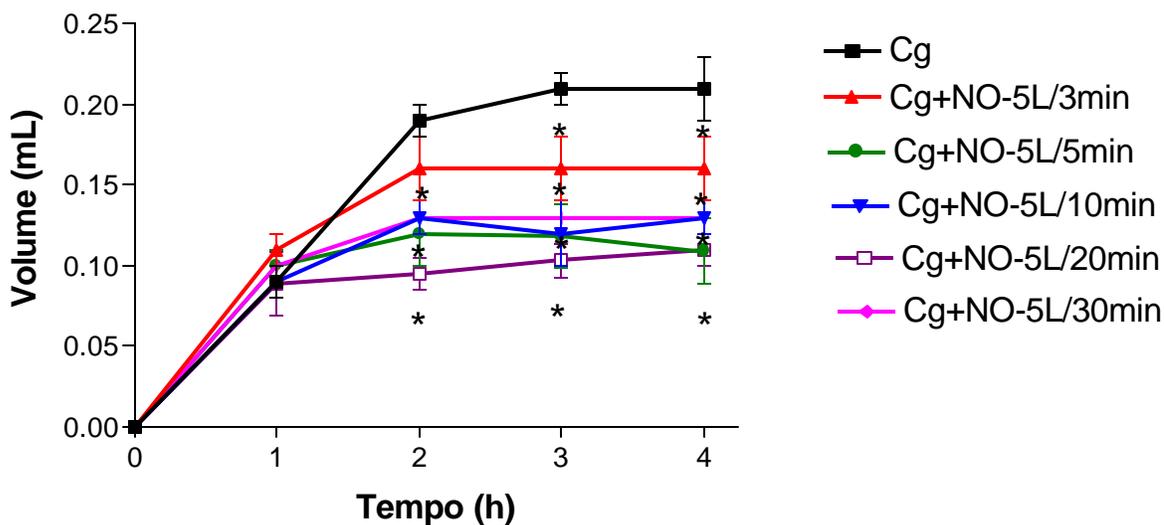
Como podemos observar no gráfico 07, o edema inflamatório induzido por histamina apresenta uma dinâmica diferente da carragenina, apresentando seu pico entre 90 e 120 minutos. A variação de volumes das patas, representando o edema induzido pela histamina também foi de menor intensidade, quando comparado com a carragenina. A terapia com óxido nítrico inalado inibiu de maneira significativa o edema de pata induzido por histamina.



**Gráfico 07** - Efeito da terapia com óxido nítrico inalado sobre o edema induzido por histamina. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p < 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

#### 4.8 - Efeito do pós-tratamento com óxido nítrico inalado no fluxos de 5 L/min em diferentes tempos de inalação sobre o Edema de Pata induzido por Carragenina.

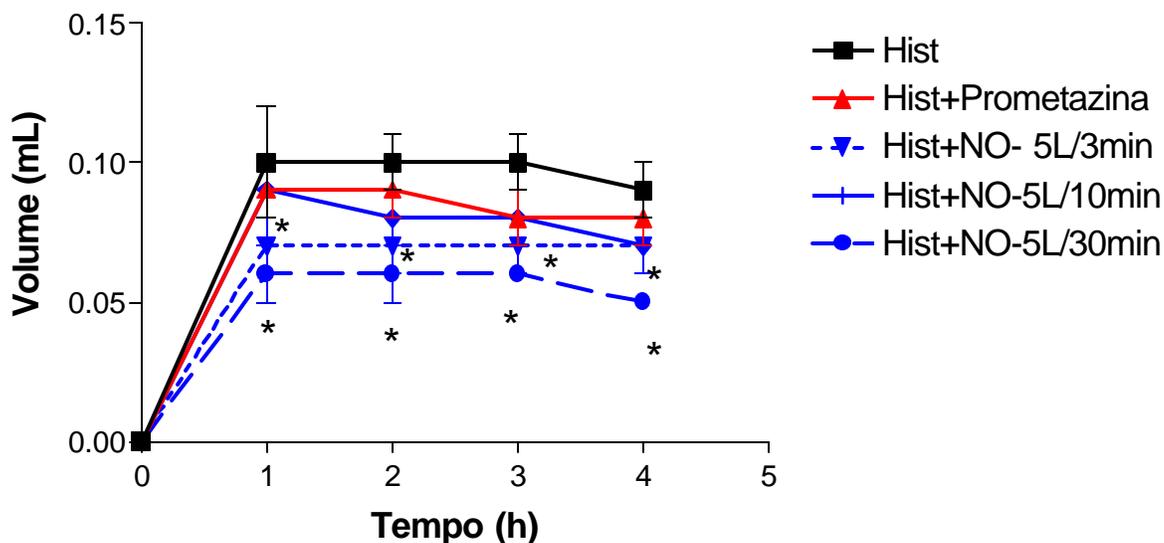
Como podemos observar no gráfico 08, o edema inflamatório induzido por carragenina em patas de camundongos, foi significativamente inibido de maneira dependente do tempo de inalação, a um fluxo constante e mínimo de 5 L/min.



**Gráfico 08** - Efeito do óxido nítrico inalado a um fluxo de 5 L/min durante 05 tempos diferentes (3, 5, 10, 20 e 30 minutos) iniciando 30 minutos após a injeção de carragenina. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

#### 4.9 - Efeito do pós-tratamento com óxido nítrico inalado no fluxos de 5 L/min em diferentes tempos de inalação sobre o Edema de Pata induzido por Histamina.

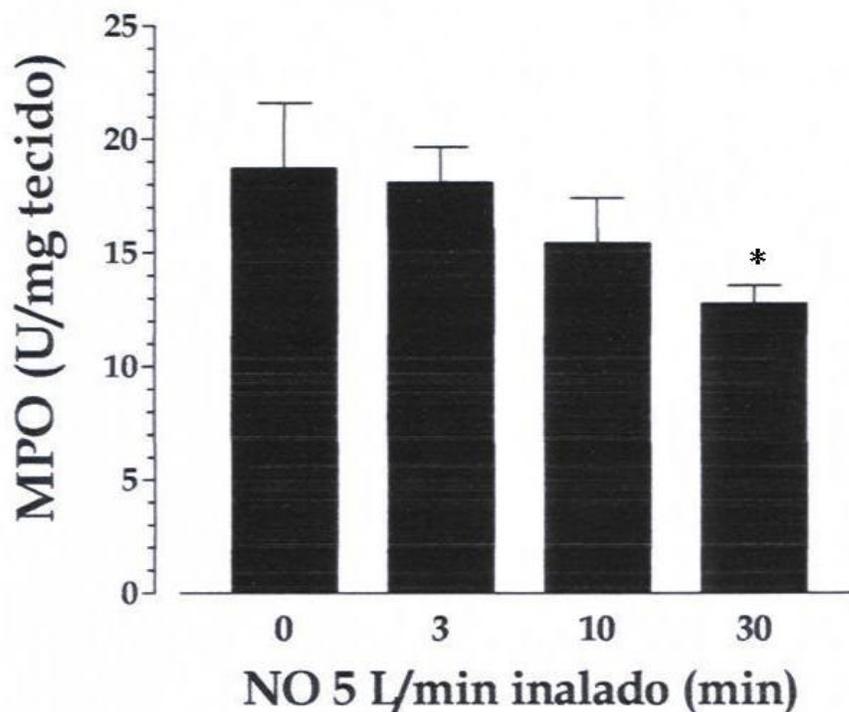
Como podemos observar no gráfico 09, o edema inflamatório induzido por Histamina em patas de camundongos, foi significativamente inibido de maneira dependente do tempo de inalação, a um fluxo constante e mínimo de 5 L/min.



**Gráfico 09** - Efeito do óxido nítrico inalado a um fluxo de 5 L/min durante 05 tempos diferentes (3, 5, 10, 20 e 30 minutos) iniciando 15 minutos após a injeção de Histamina. O gráfico representa a evolução temporal do edema de pata induzido por carragenina. n = 5 animais/grupo; \* = p < 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

#### **4.10 - Dosagem de mieloperoxidase (MPO) em patas de ratos após injeção sub-plantar de carragenina: Efeito da administração de NO por via inalatória**

Neste protocolo experimental, avaliamos a atividade da enzima mieloperoxidase, marcadora da infiltração de neutrófilos, no tecido plantar da pata de camundongos injetados com carragenina. Como podemos observar, a terapia com óxido nítrico inalado a um fluxo de 5 L/min durante diferentes tempos foi capaz de reduzir a atividade da mieloperoxidase de maneira dependente do tempo de inalação.



**Gráfico 10** - Efeito do óxido nítrico inalado a um fluxo de 5 L/min durante 05 tempos diferentes (3, 10, e 30 minutos) iniciando 30 minutos após a injeção de Carragenina. A barra 0 representa a carragenina sem inalação de óxido nítrico. O gráfico representa a atividade da enzima mieloperoxidase. n = 5 animais/grupo; \* = p 0,05, considerado estatisticamente diferente do grupo controle.

## **5. Discussão**

O NO endógeno está envolvido na inflamação aguda (IALENTI *et al*, 1992) 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. Porém, a indução desta enzima tem sido demonstrada em outras células e tecidos não pertencentes ao sistema reticuloendotelial, sugerindo que a liberação do NO deva ter outras conseqüências biológicas como vasodilatação patológica e dano tecidual (MONCADA *et al*, 1991).

A via de produção de NO através da L-arginina é o mecanismo de transdução para a guanilato ciclase solúvel, assim como, está associado a mecanismos, por meio dos quais, as células regulam suas próprias funções ou se comunicam com outras (MONCADA *et al*, 1991).

Dados sugerem que o NO é formado no sítio inflamatório e modula a formação de edema pelo aumento do fluxo sanguíneo local, pois o edema é aumentado após administração de L-arginina e diminuído após administração de inibidores de NOS. O aumento da biossíntese de prostaglandinas, contribui também, para a formação de edema através de um mecanismo independente de GMPc (SAUTEBIN *et al*, 1995), o qual possivelmente depende de uma interação direta do NO com o centro heme férrico da ciclooxygenase (LIAUDET *et al*, 2000).

Quando o NO atravessa o espaço endotelial e atinge o músculo liso vascular, ele estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel que forma

GMPc intracelular a partir de GTP. Quando o GMPc se encontra em altas concentrações, o cálcio intracelular diminui relaxando as células musculares, promovendo vasodilatação (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

De acordo com Liaudet *et al* (2000), a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO constitui a principal via de sinalização do NO, que envolve a regulação de uma disposição vasta de funções fisiológicas, incluindo não só o relaxamento de músculo liso, seja ele vascular ou não vascular, mas também como sinal de transdução no sistema nervoso, inibição de agregação plaquetária e inibição da adesão leucocitária no endotélio.

O NO inalatório apesar de ser muito utilizado em doenças pulmonares tem sido apresentado por nitrosilar hemoglobina, albumina e outras moléculas plasmáticas para formar derivados estáveis de nitrosotióis, e então, provocar um impacto na periferia, uma vez que estes compostos preservam a bioatividade e aumentam o tempo de meia vida do NO nos sistemas biológicos (JIA *et al*, 1996).

Baseando – se nisso, 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.

O presente estudo também demonstrou que a ação do NO está relacionada com a migração leucocitária, pois houve uma diminuição significativa, dependente do tempo, não só na mensuração do volume das patas como também na atividade da Mieloperoxidase, indicando que, de

acordo com o tempo de exposição ao gás, um número menor de neutrófilos atingiram o sítio inflamatório.

Foram realizados protocolos com fluxos variados de NO inalatório, porém essa redução mais significativa do edema na pata dependente do tempo pôde ser um indicativo de saturação no interior da caixa onde os animais se encontravam para a inalação do gás.

Embora os mecanismos pelos quais o NO induza uma redução do acúmulo de neutrófilos ainda não estejam completamente elucidados, Kubes *et al* (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.

Por outro lado, foi observado que a superóxido dismutase (SOD), uma enzima que cataliza a conversão de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$  (BABIOR, 2000), potencializou a ação do NO na prevenção da adesão leucocitária, indicando que o NO desenvolve um importante papel fisiológico no controle a inflamação aguda.

Outras pesquisas também demonstraram esse efeito de amenização a uma resposta inflamatória exacerbada, além de um efeito protetor contra os danos provocados pela isquemia-reperfusão dependentes de leucócitos, através do NO endógeno ou doado exogenamente, reduzindo o "rolling" e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares (KOSONEN *et al*, 2000; SECCO *et al*, 2004). Além disso, Secco *et al* (2004)

acreditam que o NO pode ser um mediador apoptótico para neutrófilos, célula característica da inflamação aguda (KUBES *et al*, 1991).

Por outro lado, evidências sugerem contradição entre esses achados, pois foi observado que animais tratados com inibidores seletivos de iNOS (aminoguanidina) ou não seletivos de NOS (L-NAME) resultaram na redução na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (FRANCO-PENTEADO *et al*, 2001). Porém, a habilidade dos inibidores de NOS em suprimir o acúmulo de leucócitos é controversa, tendo em vista seus efeitos hemodinâmicos importantes, e ainda, por provavelmente depender da sensibilidade do leito vascular com relação ao NO em cada modelo inflamatório. A pesquisa de Medeiros *et al* (1995) apresenta resultados onde o tratamento crônico com L-NAME não afetou a exsudação pleural, nem a migração de leucócitos no modelo de pleurisia induzida por carragenina indicando que o NO não modula esses fenômenos nesse leito microcirculatório.

Nossos resultados demonstraram que a inibição da migração de leucócitos induzida pelo inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME, foi dependente da dose injetada, uma vez que, na dose de 10 mg/Kg não foram observados efeitos significativos sobre o edema de pata induzido por carragenina, e na dose de 100 mg/Kg de L-NAME houve uma redução altamente significativa do edema de pata, porém em todos os grupos experimentais, e na mesma intensidade. Este perfil de inibição sugere que esta se deva a efeitos hemodinâmicos de vasoconstrição importante, e conseqüente inibição da formação do edema induzido por carragenina, de

maneira uniforme para todos os grupos tratados com esta dose de L-NAME, independente de outro tratamento concomitante.

Mariane-Pedroso *et al* (1995), apoiam essa hipótese, pois em seus estudos, demonstraram que o L-NAME inibiu o aumento da permeabilidade a partir da inibição do NO, resultando em uma vasoconstrição e que altas doses de L-arginina, substrato para a produção de NO, foram capazes de reverter esse processo. No entanto, essa pesquisa também apresentou dados sobre o gliceril trinitrato (GTN), um nitrovasodilatador, o qual não potencializou a exsudação plasmática induzida por histamina ou bradicinina e nem com a combinação de ambas com prostaglandina E<sub>1</sub>.

Na atual pesquisa, também foi utilizado o GTN com intuito de se investigar se a inibição induzida pelo tratamento com óxido nítrico inalado pudesse se dever a um processo de vasodilatação local intensa, reduzindo a pressão hidrostática na pata e, conseqüentemente, provocando a inibição da formação do edema. Mas, assim como na pesquisa acima citada, esse nitrovasodilatador não inibiu o edema das patas dos camundongos, indicando que mesmo o GTN sendo um doador de NO, a oferta de NO ao organismo e a formação de produtos ativos derivados do NO pode ocorrer de forma diferente entre os diferentes doadores.

Uma hipótese que pode ser levantada, é que no processo de inalação do NO pode haver a mistura com oxigênio resultando no derivado ativo de NO, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), inibindo o edema .

No estudo de Salvemini *et al* (1996), foi localizado um marcador da formação de ONOO<sup>-</sup>, a nitrotirosina, que no tecido da pata inflamada, sugeria

que o  $\text{ONOO}^-$  fosse gerado e pudesse ser o responsável, pelo menos em parte, pela produção de dano tecidual nesse modelo inflamatório. Além disso, propuseram que os possíveis mecanismos pelos quais os inibidores de NOS exercem seus efeitos anti-inflamatórios incluem, a inibição da infiltração de neutrófilos, prostaglandinas e NO, com conseqüente inibição da geração de  $\text{ONOO}^-$ .

Células endoteliais, neutrófilos e macrófagos têm se mostrado capazes de produzirem tanto NO como o  $\text{O}_2^-$ , consistindo com a hipótese que o  $\text{ONOO}^-$  pode ser ultimamente o responsável pela fisiopatologia previamente atribuída ao NO sozinho (SALVEMINI *et al*, 1998).

Segundo Cuzzocrea *et al* (2001), uma considerável porção dos efeitos tóxicos do NO pode ser atribuída a formação de  $\text{ONOO}^-$ , um oxidante altamente reativo produzido pela combinação de NO com  $\text{O}_2^-$ , o qual pode provocar injúria tecidual e morte celular, desordens neurológicas, doenças inflamatórias, choque endotóxico e injúrias de reperfusão aguda.

Ródenas *et al* (1998), citam que a reação entre o  $\text{O}_2^-$  e o NO para formar  $\text{ONOO}^-$  pode explicar a ação paradoxal do NO, pois este é citotóxico somente se houver suficiente  $\text{O}_2^-$  para formar  $\text{ONOO}^-$ . De outra forma ele só é capaz de promover vasodilatação, além de concluírem que o excesso de NO produzido endogenamente agiria como um mecanismo anti-inflamatório inibindo a NADPH oxidase, uma enzima de membrana que cataliza a produção de  $\text{O}_2^-$  do oxigênio e NADPH (BABIOR, 2000), na membrana dos leucócitos polimorfonucleares e limita a disponibilidade do  $\text{O}_2^-$  representando uma defesa contra a injúria mediada por radicais livres.

Estudos demonstraram que o  $\text{ONOO}^-$ , em níveis fisiológicos (concentrações nanomolares), apresentaram efeito protetor, atenuando lesões por isquemia-reperfusão dependente de leucócitos, em vários sistemas fisiológicos, devido a habilidade em modular a expressão de moléculas de adesão inibindo assim a adesão de leucócitos com o endotélio vascular (LEFER *et al*, 1997; LIU *et al*, 2000).

## **6. Conclusões**

Nossos resultados demonstram claramente o efeito antiinflamatório da terapia com óxido inalatório no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em ratos.

O óxido nítrico mostrou-se eficiente também em reduzir o edema induzido por histamina, sugerindo um efeito antiinflamatório desvinculado do estímulo inflamatório.

O efeito antiinflamatório do óxido nítrico inalado não se deve a um efeito vasodilatador, tendo em vista que a administração local do nitrovasodilatador GTN não foi capaz de provocar qualquer efeito antiinflamatório.

O efeito antiinflamatório da terapia com óxido nítrico inalado parece estar relacionado a migração de neutrófilos para a pata inflamada, tendo em vista que foi capaz de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase na pata dos animais tratados. Este fato foi confirmado pelos achados histológicos, que demonstram claramente a inibição da infiltração leucocitária nas patas dos animais tratados com óxido nítrico inalado.

## **7. Referências Bibliográficas**

ADEAGBO, A. S.; TABRIZCHI, R.; TRIGGLE, C. R. The effects of perfusion rate and NG-nitro-L-arginine methyl ester on cirazoline- and KCl-induced responses in the perfused mesenteric arterial bed of rats. **Br J Pharmacol.** v.111, n. 1, p. 13-20, 1994.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.** v.357, n. Pt 3, p. 593-615, 2001.

AL-NAEMI, H; BALDWIN A. L. Nitric oxide: role in venular permeability recovery after histamine challenge. **American Journal of Physiology** (Heart Circ. Physiol.) v.46, p. H2010-H2016, 1999.

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

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine.** v.109, p. 33-44, 2000.

BEVAN, J. A.; HENRION, D. Pharmacological implications of the flow-dependence of vascular smooth muscle tone. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 34, p.173 – 190, 1994.

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.

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.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira.** V.17, n.6, p.417-423, 2002.

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.** v. 79, p. 2105-2110, 1982.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition.** V. 72 (suppl), p. 637S-46S, 2000.

COCKS, T. M; ANGUS, J. A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature.** v.305, n. 5935, p.627-30, 1983.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional.** 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P; CAPUTI, A.P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews.** v. 53, p. 135-159, 2001.

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.

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.; PARENTE, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leukocyte emigration. **J. Pharm. Pharmac.** v. 24, p. 575-577, 1972.

FEREDONI, M.; AHMADIANI, A.; SEMNANIAN, S.; JAVAN, M. Na accurate and simple method for measurement of paw edema. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.** v.43, p. 11-14, 2000.

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. **Inflammation Research.** v. 51, p. 377-384, 2002.

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.

FERREIRA, S.H. A new method for measuring variations of rat paw volume. **Journal of Pharamacology.** v. 31, p. 648, 1979.

FOEGH, M. L.; RAMWELL, P. W. Os eicosanóides: Prostaglandina, tromboxanos, leucotrienos & compostos relacionados. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica.** 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-285.

FRANCO-PENTEADO, C. F.; DESOUZA, I.; TEIXEIRA, S. A.; RIBEIRO-DA SILVA, G.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. **Biochemical Pharmacology** . v. 61, p. 1305-1311, 2001.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: A radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**. v.201, p. 1203-1209, 1998.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. **Circ. Res.** v. 53, p. 557, 1983.

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.

GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. **Br J Pharmacol**. v.101, n. 3, p.632-639, 1990.

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.

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.

GRIFFITH, T. M., EDWARDS, D. H., LEWIS, M. J., NEWBY, A. C., HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 308, p. 645-647, 1984.

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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 1986. 346p.

HENRIQUES M. G.; WEG V. B.; MARTINS M. A.; SILVA P.M.; FERNANDES P. D.; CORDEIR 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.

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.

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

IGNARRO, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circ Res.** v. 65, n. 1, p.1-21, 1989.

IGNARRO, L.J. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension.** v.16, p. 477-483, 1990.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 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.

KEANE, M.; STRIETER, R. Chemokine signaling in inflammation. **Critical Care Medicine.** v.28, n. 4 (suppl.), p. N13-N26, 2000.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J.** v.298, n. Pt 2, p. 249-58, 1994.

KOLLER, A.; MESSINA, E.J.; WOLIN, M.S.; KALEY, G. Effects of endothelial impairment on arteriolar dilator responses in vivo. **Am. J. Physiol.** v.257, p. H1485-1489, 1989.

KOLLER, A.; SUN, D.; HUANG, A.; KALEY, G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. **Am. J. Physiol.** v. 267, n. (1 Pt 2), p. H326-332, 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 Pharmacology.** v.394, p. 149-156, 2000.

KUBES, P.; HUNTER, J.; GRANGER, D. N. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. **Gastroenterology.** v.103, n. 3, p.807-812, 1992.

KUBES, P.; GRANGER, D. N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. **Am J Physiol.** v.262, n. 2 Pt 2, p. H611-H615, 1992.

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.; PAYNE, D.; GRISHAM, M. B.; JOURD-HEUIL, D.; FOX-ROBICHAUD, A. Inhaled NO impacts vascular but not extravascular compartments in postischemic peripheral organs. **American Journal of Physiology (Heart Circ. Physiol.)** v.46,p. H676-H682, 1999.

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

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. **The Journal of Clinical Investigation.** 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

LIAUDET, L.; SORIANO, F. G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine.** v. 28, n. 4 (suppl.), p. N37-N52, 2000.

LIU, P.; XU, B.; QUILLEY, J.; WONG, P. Y. K. Peroxynitrite attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology** (Cell Physiol.). v.279, p. C1970-1977, 2000.

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.

MACKENDRICK, W.; CAPLAN, M.; HSUEH, W. Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. **Pediatr. Res.** v. 34, n. 2, p.222-228, 1993.

MARIANE-PEDROSO, S. R.; BIZETO, L.; ANTUNES, E. ; ZATZ, R.; NUCCI, G. Dissimilarity between prostaglandin E<sub>1</sub> and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 52, p. 399-402, 1995.

MARTIN, W.; VILLANI, G. M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R. F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 232, n. 3, p.708-716, 1985.

MARTIN, W.; VILLANI, G. M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R. F. Blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 233, n. 3, p.679-685, 1985.

MEDEIROS, M. V.; BINHARA, I. M.; MORENO JÚNIOR, H.; ZATZ, R.; NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **European Journal of Pharmacology**. v.285, p. 109-114, 1995.

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

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharamcology. **Pharamcological Reviews**. v. 43, n. 2, p. 109-143, 1991.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PALMER, R. M.; REES, D. D.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.153, n. 3, p.1251-1256, 1988.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** v.101, n. 3, p.746-52, 1990

RÓDENAS, J.; MITJAVILA, M. T; CARBONELL, T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. **American Journal of Physiology (Cell Physiol.)** v. 274, n. 43, p. C827-C830, 1998.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova.** v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

RUBANYI, G. M.; LORENZ, R. R.; VANHOUTTE, P. M. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. **Am. J. Physiol.** v. 249, p. H95-H101, 1985.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; BOURDON, D. M.; STERN, M. K.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **Eur. J. Pharmacol.** v.303, n. 3, p. 217-220, 1996.

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. **British Journal of Pharmacology.** v.118, p. 829-838, 1996.

SALVEMINI, D; WANG, Z; STERN, M. K.; CURRIE, M. G.; MISKO, T. P. Peroxynitrite decomposition catalysts: Therapeutics for peroxynitrite mediated- pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.95, p. 2659-2663, 1998.

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

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. **Biochem Pharmacol**. v.55, n.7, p. 1113-7, 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.

SECCO, D. 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, 2004.

SIGNORINI, J. L.; SIGNORINI, S. L. **Atividade física e radicais livres. Aspectos biológicos, químicos fisiopatológicos e preventivos**. São Paulo: Ícone, 1993. 160p.

SPADAFORA-FERREIRA, M.; COELHO, V.; NORONHA, I. L.; PORTUGAL, K.; KALIL, J. O endotélio vascular na resposta imune. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. v. 6, n. 2, p. 146-154, 1996.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**. v. 8, n. 9: 877-887, 2001.

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.

TODA, N.; OKAMURA, T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. **Pharmacol. Rev.** v.55, n. 2, p.271-324, 2003.

TRONCY, E.; FRANCOEUR, M.; SALAZKIN, 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.** v. 79, n. 5, p.631-640, 1997.

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

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.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. **Circulation.** v. 80, p. 1-9, 1989.

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

WEBSTER, N. R.; GALLEY, H. F. Inflammation and immunity. **British journal of Anaesthesia.** v. 3, n. 2, p. 54-58, 2003.

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. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v. 111, p. 544-547, 1962.

YOSHIKAI, Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v.14, n. 3, p. 257-263, 2001.

ZWART, L. L. de; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radicals damage applications in experimental animals and humans. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 26, n. 1, p. 202-226, 1999.