

Marta Valéria Medeiros

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA
CARRAGENINA EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia**

Orientador: Dr. Edson Antunes

**Campinas
1995**

**M467p
25536/BC**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

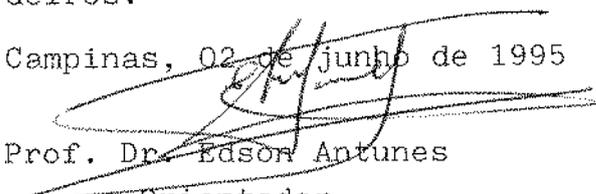
1. Prof. Dr. Edson Antunes 
2. Prof. Dr. Susana Beatriz Verissimo de Mello 
3. Prof. Dr. Antonio Condino Neta 

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/06/95

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Marta Valéria Medeiros.

Campinas, 02 de junho de 1995


Prof. Dr. Edson Antunes

- Orientador -

**“...Os homens podem ter nascido livres, mas não sábios.
O dever da Universidade é acrescentar a sabedoria à
liberdade.”**

(Adlai Stevenson)

**Ao Lucas, meu sobrinho, que há 16
meses despertou em mim o sentimento, até então, desconhecido**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, orientador deste trabalho, pela oportunidade, pelos grandes ensinamentos, pela paciência, hoje pela minha formação, e sempre pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, também pela oportunidade, e pelo grande incentivo ao desenvolvimento da ciência.

Ao Airton, Toninho, Adilson, por todo trabalho técnico prestado.

Ao Sr. Miguel, pelo carinho com o qual trata os animais.

À Dora, secretária, pela ajuda fundamental e pela eficiência com a qual realiza o seu trabalho.

Ao Sérgio pela eficiente administração.

Ao CNPQ e a FAPESP pelo apoio financeiro cedido.

**“Quando existe a convicção de que está havendo
um avanço diário, mesmo que de um passo apenas,
pode-se sentir pela vida uma razão de viver
iluminada pela esperança de VENCER”.**
(M.Tamiguchi)

À Cléria (Clérinha) por todo apoio no início do aprendizado e pelo exemplo de amizade verdadeira.

À Iramaia pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À Alessandra e Ana Maria (Aninha), grandes amigas, pela paciência e pela presença sempre nas horas em que mais precisei.

Ao Anicleto (Nick) e Wellington (Wellitinho) pela valiosa ajuda com o computador e pela confiança.

A Soraia (Flávio), Sisi (Helinho), Dora (Abdo), Luciana Bizeto (passaralha), Suzana, Rossana (Rossanitha) e Heloísa (Helô), que sempre estiveram presentes nas horas alegres.

Ao Edilson, grande primo e amigo, pelo companheirismo e pelas palavras certas, em horas certas.

À todos os amigos do Departamento de Farmacologia, pelo carinho e amizade que a convivência diária nos trouxe.

**A alegria é um cristal
Nada precisa ter forma
Mas a coisa precisa estritamente dela para existir**

A minha mãe pelo estímulo e confiança

A Deus por permitir-me concluir mais uma etapa

Aos animais que vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, o meu respeito e eterna gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1. Procedência dos animais	12
2.2. Edema de pata	12
2.3. Permeabilidade vascular	12
2.4. Pleurisia	13
2.5. Modelo de hipertensão 2K-1C	14
2.6. Medida de pressão arterial	14
2.7. Protocolo experimental	14
2.7.1. Tratamento agudo	14
2.7.2. Tratamento crônico	14
2.8. Reagentes utilizados	15
2.9. Análise estatística dos dados	15
3. RESULTADOS	16
3.1. Tratamento agudo	17
3.1.1. Edema de pata	17
3.1.2. Permeabilidade vascular	17
3.1.3. Efeito do iloprost	21
3.1.4. Pleurisia	21
3.2. Tratamento crônico	28
3.2.1. Pressão arterial sistêmica	28
3.2.2. Edema de pata	28
3.2.3. Permeabilidade vascular	29
3.2.4. Efeito do iloprost	34
3.2.5. Efeito do captopril	34
3.2.6. Efeito do L-NAME em animais 2K-1C	37
3.2.7. Pleurisia	37

4. DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ABSTRACT	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Efeito da administração aguda subplantar de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) e D-nitro arginina metil éster (D-NAME) sobre o edema de pata induzido por carragenina.

18

Figura 2- Efeito da administração aguda endovenosa de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) e D-nitro arginina metil éster (D-NAME) sobre o edema de pata induzido por carragenina.

19

Figura 3- Efeito da administração aguda subplantar e endovenosa de L-NAME sobre a permeabilidade vascular induzida por carragenina.

20

Figura 4- Efeito da administração subplantar de iloprost sobre a inibição causada pelo L-NAME no edema de pata induzido por carragenina.

22

Tabela 1- Efeito da administração aguda de carragenina sobre a cavidade pleural dos animais.

23

Figura 5- Efeito da administração aguda intrapleural de L-NAME e D-NAME sobre a pleurisia induzida por carragenina.

24

Figura 6- Efeito da administração aguda intrapleural de L-NAME sobre a migração diferencial de células induzida por carragenina.

25

Figura 7- Efeito da administração aguda endovenosa de L-NAME e D-NAME sobre a pleurisia induzida por carragenina.

26

Figura 8- Efeito da administração aguda endovenosa de L-NAME sobre a migração diferencial de células induzida por carragenina.

27

Tabela 2 Efeito da administração crônica de L-NAME, L-NAME + captopril e somente captopril, na evolução ponderal dos animais.

30

Figura 9- Medida de pressão arterial avaliada em 2 e 4 semanas de tratamento crônico com L-NAME e D-NAME. Efeito do captopril em animais controles normotensos e animais hipertensos por oclusão da artéria renal esquerda (2K-1C).

31

Figura 10- Efeito da administração crônica por 2 semanas de L-NAME e D-NAME sobre o edema de pata e permeabilidade vascular induzidos por carragenina.

32

Figura 11- Efeito da administração crônica por 4 semanas de L-NAME sobre o edema de pata e permeabilidade vascular induzidos por carragenina.

33

Figura 12- Efeito do iloprost sobre a inibição causada pela administração crônica de L-NAME por 4 semanas no edema de pata induzido por carragenina.

35

Figura 13- Efeito do captopril frente a inibição causada pela administração crônica de L-NAME por 4 semanas no edema de pata induzido por carragenina.

36

Figura 14- Efeito do edema de pata induzido por carragenina em animais hipertensos 2K-1C.

38

Tabela 3- Infiltração de leucócitos e contagem diferencial de células em animais tratados cronicamente com L-NAME (ou D-NAME).

39

RESUMO

Neste trabalho, investigamos os efeitos do tratamento agudo e crônico com N^o-nitro-L- arginina metil éster (L-NAME) e nitro-D-arginina metil éster (D-NAME) sobre a resposta inflamatória (edema de pata, permeabilidade vascular e pleurisia) induzida pela carragenina em ratos.

A administração subcutânea na região plantar (0.15-1.0 $\mu\text{mol/pata}$) ou endovenosa (35-100 $\mu\text{mol/kg}$) de L-NAME reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina. O efeito inibitório do L-NAME foi revertido pela administração de iloprost (0.3 nmol/pata). D-NAME, nestas mesmas doses, não interferiu na resposta edematogênica induzida por carragenina. A administração endovenosa de L-NAME (100 $\mu\text{mol/kg}$) reduziu de maneira significativa o extravasamento de proteínas plasmáticas. Entretanto, quando o L-NAME foi injetado na pata (1.0 $\mu\text{mol/pata}$), não foi capaz de reduzir o extravasamento de proteínas. A injeção intrapleural (3 e 10 $\mu\text{mol/cavidade}$) ou endovenosa (35 e 100 $\mu\text{mol/kg}$) de L-NAME inibiu ($p < 0.05$) a migração leucocitária. D-NAME (em doses altas) não interferiu na migração leucocitária induzida por carragenina.

A administração por via oral de L-NAME (aproximadamente 75 $\mu\text{mol/rato/dia}$), mas não D-NAME (mesma dose) diluídos em água por duas ou quatro semanas, produziu elevação significativa da pressão arterial dos animais. O tratamento com L-NAME (mesma dose), por duas ou quatro semanas, reduziu ($p < 0.05$) o edema de pata de rato, porém, não interferiu significativamente com o extravasamento de proteínas plasmáticas. A administração de iloprost (0.3 nmol/pata) reverteu significativamente a inibição causada pelo tratamento com L-NAME durante quatro semanas. Animais tratados com captopril por quatro semanas não apresentaram modificação significativa em relação a inibição causada pelo L-NAME. Animais 2K-1C apresentaram resposta edematogênica significativamente maior do que animais

controles normotensos, porém a inibição causada pelo tratamento crônico com L-NAME (duas ou quatro semanas) neste grupo de animais foi de magnitude similar ao seu grupo controle. A migração leucocitária e o volume de exudato induzidos por carragenina não foram alterados em animais tratados cronicamente com L-NAME por duas ou quatro semanas.

Estes resultados indicam que o óxido nítrico modula a formação local de edema provavelmente por regular o fluxo sanguíneo local em vez de afetar diretamente a permeabilidade. Os resultados obtidos em pleurisia indicam que o óxido nítrico não modula a migração celular no leito microcirculatório pleural do rato.

INTRODUÇÃO

A reação inflamatória aguda representa uma reação local de defesa do organismo em resposta a estímulos nocivos. Isto envolve interações complexas entre células do sangue e do tecido lesado, levando a vasodilatação local e aumento do fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade microvascular com consequente extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema e, infiltração de leucócitos na área lesada. A reação inflamatória pode ainda ser acompanhada por hiperalgesia em decorrência da estimulação de nociceptores, por compressão das terminações nervosas pelo exudato inflamatório. Todos esses fenômenos são mediados pela liberação de diferentes mediadores de origem celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, fator ativador de plaquetas, proteínas catiônicas) ou plasmática (cininas, frações do sistema complemento e frações do sistema de coagulação). Cada um desses mediadores é, geralmente, responsável por um evento em particular da resposta inflamatória.

Dessa forma, a administração local de um mediador em potencial deverá evocar parte da resposta inflamatória pelo qual o mesmo é supostamente responsável. Na inflamação experimental induzida por carragenina em patas de ratos, acredita-se que ocorra inicialmente uma primeira fase (em torno da 1ª hora após o estímulo) com participação de histamina e serotonina oriundos da degranulação de mastócitos. Em uma segunda fase (2ª - 3ª hora após o estímulo), ocorreria a liberação de cininas plasmáticas e, finalmente, uma terceira fase (3ª - 4ª hora após o estímulo) onde as prostaglandinas seriam os principais mediadores presentes no sítio inflamado (Di Rosa *et al.*, 1971). Recentemente, foi relatado que a fase tardia do edema de pata induzido pela carragenina é mediada principalmente por radicais de oxigênio (Boughton-Smith *et al.*, 1993). Assim, a carragenina representa um bom exemplo de substância usada experimentalmente capaz de demonstrar que o processo inflamatório é multi-mediado e onde os mediadores possivelmente interagem entre si no sentido de favorecer o desenvolvimento do processo inflamatório.

Na verdade, foi a partir dos trabalhos pioneiros de Williams & Morley (1973) que ficou demonstrado a existência de sinergismo entre diversos mediadores da inflamação. Neste trabalho, os autores demonstraram que injeções intradérmicas de histamina ou bradicinina em pele de cobaias, causavam um extravasamento de albumina plasmática dependente da dose utilizada, sendo esta resposta marcadamente potenciada pela co-injeção de pequenas doses de prostaglandinas E_1 e E_2 . Este fenômeno não representava apenas uma adição de resposta destes mediadores, visto que injeções intradérmicas individuais de prostaglandinas não causavam extravasamento significativo de albumina plasmática. Os autores demonstraram ainda que este fenômeno era também observado em reações inflamatórias endógenas do tipo I, III e IV e concluíram que as prostaglandinas representam um papel importante em processos inflamatórios. Mais tarde, Williams & Peck (1977), mediram simultaneamente o fluxo sanguíneo e a exudação plasmática induzida por histamina e bradicinina em pele de coelho e concluíram que a potenciação da resposta edematogênica induzida pelas prostaglandinas E_1 e E_2 era decorrente de vasodilatação local e não de aumento na permeabilidade microvascular. Simultaneamente, foi demonstrado que a PGE_1 potenciava marcadamente o aumento da permeabilidade microvascular induzido pela substância P em pele de ratos (Chahl, 1977).

Posteriormente, foi demonstrado em pele de coelho, que a prostaciclina produzia um aumento de fluxo sanguíneo local, sendo também capaz de potenciar o aumento de exudação plasmática induzida pela injeção intradérmica de bradicinina ou zymosan, em decorrência de sua potente ação vasodilatadora local (Williams, 1979). Utilizando as mesmas técnicas e medindo as mesmas variações, Williams (1982) demonstrou que o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) não apresentava efeito sobre a permeabilidade microvascular quando administrado individualmente mas potenciava marcadamente o aumento de permeabilidade produzido por bradicinina. Mais tarde, Gamse & Saria (1985), investigaram o efeito de taquicininas e peptídeo relacionado com o gene da

calcitonina (CGRP) no extravasamento de proteínas plasmáticas em pele de ratos. Tais autores demonstraram claramente que o CGRP potenciava marcadamente o aumento de permeabilidade microvascular induzida por taquicininas e concluíram que taquicininas mediavam apenas extravasamento de proteínas enquanto o CGRP mediava apenas vasodilatação. A ação conjunta de ambos os peptídeos resultava em um acentuado extravasamento de proteínas plasmáticas, o que não era verificado com a administração individual destes agentes. Estes resultados apoiam, mais uma vez, as hipóteses anteriormente formuladas, onde autores demonstram que o tônus arteriolar modula a formação de edema. Em outras palavras, a injeção local de vasodilatadores (PGE_1 , PGE_2 , prostaciclina, VIP e CGRP) promoviam vasodilatação arteriolar resultando em um maior aporte sanguíneo na área inflamada e maior extravasamento de proteínas e fluidos.

Por outro lado, outros autores demonstraram que os vasodilatadores potenciavam a resposta edematosa não somente por causarem aumento de fluxo sanguíneo local mas também por atuarem diretamente sobre a permeabilidade em nível de endotélio venular pós-capilar. Em membro posterior de cão anestesiado, Amelang *et al.*, (1981) caracterizaram os efeitos da PGE_1 quando injetada individualmente ou em combinação com histamina e bradicinina. Os autores demonstraram que a prostaglandina E_1 produziu uma potenciação da ação inflamatória induzida por histamina (e bradicinina) e atribuíram este efeito a uma ação direta da PGE_1 na membrana microvascular endotelial levando a um aumento no número de fendas (gaps) venular, que não seria influenciado por variações no fluxo sanguíneo local. Na presente preparação, os autores têm a vantagem de poder fixar o fluxo sanguíneo em um determinado valor ou de trabalhar apenas com o fluxo normal da preparação.

Posteriormente, Yong & Mayhan (1992) avaliaram os efeitos da associação de PGE_1 e LTC_4 na permeabilidade microvascular em bochecha de hamster *in vivo* e sugeriram que o sinergismo de PGE_1 no aumento de

permeabilidade vascular induzido por LTC_4 não era mediado por ação vasodilatadora da PGE_1 . Em pele de coelho, foi demonstrado ainda que a PGE_1 potenciava o edema por um mecanismo independente do fluxo sanguíneo (Pedroso-Mariani *et al.*, 1995). Isto foi concluído basicamente pela observação que vasodilatadores (nitroprussiato de sódio, gliceril trinitrato e molsidomine), doadores de óxido nítrico, apesar de causarem vasodilatação local, não modificavam a resposta edematogênica induzida pela histamina e bradicinina.

Neste contexto, vários estudos demonstram que o endotélio participa ativamente na reatividade de vasos sanguíneos. A liberação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF; Furchgott & Zawadzki, 1980) por diversos agonistas vasoativos promove vasodilatação por relaxamento da musculatura lisa vascular e dessa forma, é um dos responsáveis pela manutenção do tônus dilatador dos vasos. Agentes flogogênicos e mediadores inflamatórios liberam EDRF de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (Rimele *et al.*, 1988; Sturn *et al.*, 1989; McCall *et al.*, 1989). Portanto, na reação inflamatória aguda são encontradas todas as condições para a produção, síntese e degradação de EDRF, indicando que tal substância possa se constituir em um novo mediador inflamatório.

O fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) foi descrito inicialmente por Furchgott & Zawadzki (1980) como um composto produzido pelo endotélio vascular e responsável pelo relaxamento vascular induzido por acetilcolina em anéis de aorta com endotélio íntegro. Atualmente, sabe-se que diversas outras células ou órgãos são capazes de sintetizá-lo como, por exemplo, astrócitos (Murphy *et al.*, 1990), mastócitos (Salvemini *et al.*, 1990), homogenatos de cérebro (Garthwaite *et al.*, 1988), neutrófilos e células mononucleares (Salvemini *et al.*, 1990), hepatócitos (Curran *et al.*, 1989), células do ambiente articular, tais como, condrócitos (Stadler *et al.*, 1991) e sinoviócitos (Stefanovic-Racic *et al.*, 1994).

Com relação à natureza química do EDRF, sabe-se, atualmente que é o óxido nítrico (NO; Feelisch *et al.*, 1994), um estimulador endógeno da guanilato ciclase solúvel. O NO é sintetizado a partir do nitrogênio guanidino terminal do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas, as sintetases de óxido nítrico (NOS). Esta reação é enantiomericamente específica visto que a D-arginina não atua como precursora do EDRF (Palmer *et al.*, 1988). Sabe-se da existência de pelo menos dois tipos de NO sintetases. A forma constitutiva a qual é citosólica, Ca^{2+} /calmodulina-dependente e libera NO por curtos períodos de tempo em resposta a ativação de receptores ou estimulação física. A outra enzima é induzida por ativação de várias células ou órgãos, por citocinas e, uma vez expressa, sintetiza NO por longos períodos de tempo. Além disso, esta enzima é citosólica, Ca^{2+} -independente e sua indução é inibida por glicocorticóides (Moncada *et al.*, 1992). A síntese de NO pelo endotélio vascular se dá por ativação da NO sintetase constitutiva. Nesse leito em particular, o NO é responsável pelo tônus vasodilatador, o qual é essencial para a regulação da pressão sanguínea.

O óxido nítrico produz também inibição da adesão e agregação plaquetária *in vitro* (Furlong *et al.*, 1987) e *in vivo* (May *et al.*, 1991), contribui na regulação de contratilidade cardíaca e, sendo liberado de terminais não adrenérgicos-não colinérgicos (NANC), pode contribuir para a regulação do fluxo sanguíneo em certos leitos vasculares (Moncada *et al.*, 1992). O NO apresenta ainda diversas outras ações biológicas incluindo inibição da síntese de PGE_2 , TXA_2 , IL-6 (Stadler *et al.*, 1993) e inibição da produção de ânions superóxidos de neutrófilos (Clancy *et al.*, 1992).

A identificação de alguns análogos da L-arginina (Figura A) têm sido fundamental para o entendimento da via L-arginina/óxido nítrico em vários sistemas. Estes análogos são descritos sobretudo como inibidores da síntese de NO. O N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA) foi o primeiro inibidor disponível comercialmente e possui ampla ação no organismo pois inibe a liberação de

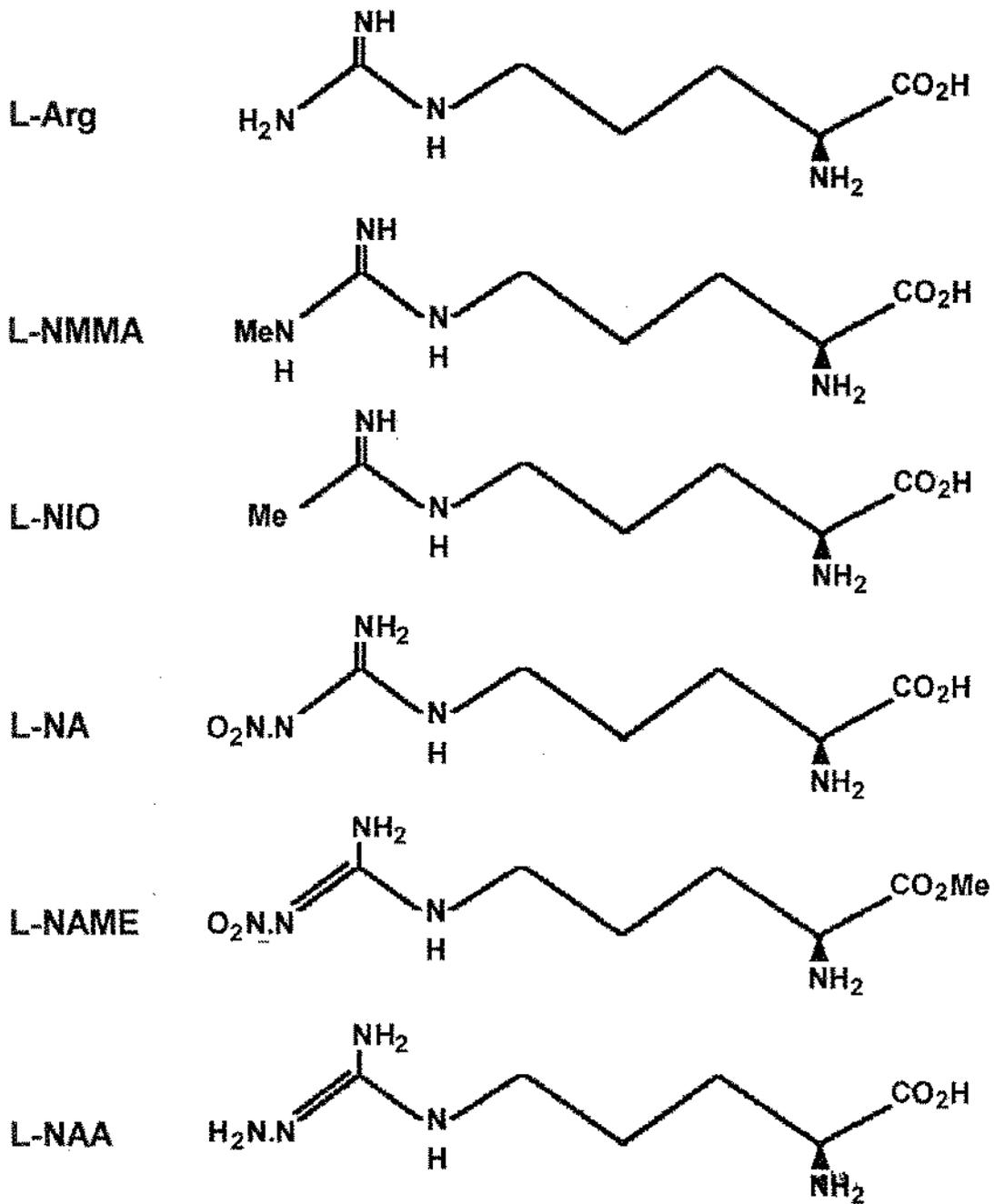
EDRF em macrófagos (Marletta *et al.*, 1988), fibroblastos de pulmão de rato (Ishii *et al.*, 1990), músculo circular do íleo humano (Maggi *et al.*, 1991), aorta de suíno (Palmer *et al.*, 1988), aorta de coelho (Rees *et al.*, 1989), em microcirculação de mesentério exteriorizado de rato *in situ* (Fortes *et al.*, 1990) e outros sistemas (Moncada *et al.*, 1992). Atualmente, o L-NAME (Moore *et al.*, 1990) é o inibidor da síntese de NO preferencialmente usado pelos pesquisadores em virtude de seu baixo custo comercial e por apresentar uma potente ação inibitória sobre as NO sintetases constitutiva e induzível.

Outros análogos da L-arginina tais como a L-nitro arginina (Ishii *et al.*, 1990; Maggi *et al.*, 1991), N^w-nitro arginina benzil éster (Thomas & Ramwell, 1991) e N^G-amino-L-arginina (Fukuto *et al.*, 1990), também inibem a síntese de NO.

Com relação ao efeito dos inibidores de NO na resposta inflamatória aguda, foi observado inicialmente que o L-NMMA inibia significativamente o edema de pata de rato induzido por poliarginina (Antunes *et al.*, 1990). Esses autores demonstraram posteriormente que o L-NMMA inibia também o edema de pata de rato induzido por bradicinina, composto 48/80 e serotonina (Antunes *et al.*, 1992).

Utilizando o L-NAME, Hughes *et al.*, (1990), demonstraram que este inibia o edema induzido por substância P em pele de rato e que esta inibição era enantiomericamente específica, visto que o D-NAME não apresentava efeito inibitório. O L-NAME inibiu também a formação de edema induzido pela carragenina e dextran em pele de rato e este efeito inibitório era revertido por L-arginina (Ialenti *et al.*, 1992). Em pele de cobaias, o L-NAME inibia a formação de edema e o acúmulo de leucócitos induzidos por PAF e zymosan (Teixeira *et al.*, 1993).

Figura A



Em 1994, Giraldeho *et al.*, avaliaram os efeitos do L-NAME e derivados da arginina em geral sobre o edema de pata de ratos induzido por serotonina e bradicinina. Os autores demonstraram que a arginina e todos os seus análogos eram capazes de degranular mastócitos por um mecanismo dependente da carga catiônica destes compostos.

Em modelos de inflamação crônica, o NO parece desempenhar também um papel importante (Stefanovic-Racic *et al.*, 1993). Assim, em ratos tratados com fragmentos de parede celular de estreptococos, tem sido demonstrado que as articulações inflamadas apresentam uma produção elevada de NO (McCartney-Francis *et al.*, 1993). Neste caso, a administração diária endovenosa do L-NMMA inibia significativamente ambos, a inflamação sinovial e os danos tissulares. Resultados semelhantes foram observados por Ialenti *et al.*, 1993, na artrite experimental induzida por adjuvante de Freud em ratos. Estes resultados demonstraram que o L-NAME inibia o edema inflamatório ao longo do período observado e, que excesso de L-arginina potenciava o quadro inflamatório. Na artrite induzida por adjuvante em ratos foi também demonstrado que a administração diária do L-NMMA por via oral durante dezoito dias inibia a biossíntese de NO (medido pelos níveis de nitrito e nitrato urinários) e o edema inflamatório, assim como prevenia as alterações histopatológicas presentes nas articulações artríticas (Stefanovic-Racic *et al.*, 1994). Estes trabalhos tem mostrado em conjunto que, de fato, o NO desempenha um papel importante no desenvolvimento de respostas inflamatórias crônicas como artrite e indicam que inibidores da síntese de NO possam constituir-se futuramente em potentes anti-inflamatórios para uso clínico.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel do óxido nítrico na resposta inflamatória induzida por carragenina em ratos, utilizando os modelos de edema de pata e pleurisia. Os animais foram tratados aguda ou cronicamente com L-NAME e seu enantiômero inativo D-NAME. Visto que o tratamento crônico com L-NAME causa hipertensão (Ribeiro *et al*, 1992), investigamos o efeito do L-NAME em duas situações diferentes, como controle dos nossos experimentos: *(i)*. Em animais hipertensos por oclusão da artéria renal (animais 2K-1C) e *(ii)*. Em animais hipertensos por L-NAME mas que receberam concomitantemente captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina), no sentido de manter a produção de óxido nítrico inibida, mas com níveis de pressão arterial próximos ao normal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Procedência dos animais

Foram utilizados ratos machos Wistar procedentes do Biotério Central da UNICAMP.

2.2. Edema de pata

Ratos machos Wistar (100-250 g), mantidos com água e comida *ad libitum*, foram anestesiados superficialmente com éter e submetidos a uma injeção subplantar de 0.1 ml de carragenina (1 mg/pata, dissolvido em solução fisiológica) na pata traseira esquerda. Esta dose foi previamente selecionada a partir de uma curva dose-efeito.

O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália).

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento do volume da pata (ml), calculado por subtração do volume inicial. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

2.3. Permeabilidade vascular

Ratos machos Wistar (100-250 g) foram anestesiados superficialmente com éter e submetidos a uma injeção endovenosa de 0.5 ml de solução de azul de Evans (25 mg/kg) imediatamente antes da injeção subplantar da carragenina. Após quatro horas, os animais foram sacrificados sob anestesia com éter. As patas foram então removidas, picadas e incubadas com 5 ml de formamida à 37°C por 48 horas. A seguir, as soluções foram filtradas e a concentração de azul de Evans obtida na extração com formamida foi medida em espectrofotômetro (modelo Uvikon 910) à 619 nm. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão, a qual foi obtida acrescentando-se concentrações crescentes do corante em diferentes tubos contendo formamida (Lykke & Cummings, 1969).

2.4. Pleurisia

Ratos machos Wistar (100-250 g) foram anestesiados superficialmente com éter e submetidos a uma injeção intrapleural de 200 µl de carragenina (0.1-1.0 mg/cavidade) ao nível do sexto espaço intercostal esquerdo. As incisões foram suturadas e os animais recuperaram-se da anestesia. Após quatro horas, os animais foram novamente anestesiados com éter e exsanguinados por secção dos vasos cervicais.

O tórax foi cuidadosamente aberto e a cavidade pleural lavada com 5 ml de tampão salina-fosfato heparinizado (pH=7.4, 5 U de heparina /ml). O tampão injetado foi aspirado juntamente com o exudato formado na cavidade pleural e, o volume total mensurado. Exudato contaminados com sangue foram desprezados. Uma alíquota de 20 µl do lavado pleural foi diluída em solução de Turk (1:20) e submetida à contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer. O resultado final foi expresso como nº de células totais $\times 10^6$ /cavidade. A contagem diferencial de células foi avaliada em esfregaços corados pela técnica de May-Grunwald.

2.5. Modelo de hipertensão por oclusão da artéria renal (2 kidney-1 clip; 2K-1C)

Foram utilizados ratos machos Wistar (150-180 g) anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal, 40 mg/Kg/i.p). Os animais foram submetidos a uma incisão dorsolateral esquerda, através da qual foi exposto o rim esquerdo e isolado o pedículo renal. A artéria renal (presente no pedículo renal) foi envolvida por um grampo (clip) de prata, com 0.2 mm em seu diâmetro interno. Em seguida, o rim foi cuidadosamente recolocado no abdomen do animal e a incisão fechada. Nos animais controles, o grampo foi imediatamente retirado, antes que o rim fosse recolocado no abdomen. Os animais após se recuperarem da anestesia tiveram livre acesso a comida e água. O método foi validado quando os animais apresentaram hipertensão crescente no decorrer do tratamento e pela ausência de atrofia renal ao final do tratamento.

2.6. Medida de pressão arterial

A pressão arterial sistêmica de animais não anestesiados foi medida utilizando-se o método de esfigmomanômetro para cauda (tail-cuff; Zatz, 1990). Os animais foram colocados em uma caixa e aquecidos a uma temperatura máxima de 40°C por 20 minutos, o que produziu uma discreta vasodilatação da artéria caudal. A pressão foi medida com um esfigmomanômetro e um microfone acoplado a um amplificador de pulso do tipo Friedman-Freed (Pacific Industrial Electronics Company) o qual foi conectado a um osciloscópio e inserido na porção proximal da cauda do rato. O "cuff" foi subsequentemente inflado a um nível elevado de pressão acima da pressão do animal e lentamente desinflado observando simultaneamente na tela do osciloscópio o aparecimento das oscilações correspondentes às pulsações arteriais. Durante todo o período experimental, a pressão arterial sistêmica de todos os animais foram avaliadas duas vezes por semana, em dias não consecutivos, sendo a média desses valores utilizada como representativa do valor semanal. Os resultados (média \pm erro padrão da média) foram expressos em mmHg.

2.7. Protocolo experimental

2.7.1. Tratamento agudo

Os animais foram injetados agudamente com L-NAME (ou D-NAME) pelas vias subcutânea na região plantar (0.15-1.0 μ mol/pata) ou intrapleurai (0.1-10 μ mol/cavidade) concomitantemente à injeção subplantar ou intrapleurai de carragenina. L-NAME e D-NAME foram também administrados endovenosamente (35-100 μ mol/kg) imediatamente antes da injeção subplantar ou intrapleurai de carragenina.

2.7.2. Tratamento crônico

O tratamento crônico com L-NAME foi realizado como descrito previamente (Ribeiro et al., 1992). Os animais receberam L-NAME (ou D-NAME) por via oral diluídos em água por um período máximo de quatro semanas. L-NAME (ou D-NAME) foi dissolvido na água a uma concentração de 1.2 mM de forma que a dose diária foi aproximadamente de 75 μ mol/rato (20 mg). Animais controles receberam o mesmo volume de água. A ingesta hídrica diária e a evolução ponderal dos animais foram avaliados semanalmente.

Com o objetivo de avaliar o efeito da hipertensão, causada pelo tratamento crônico com L-NAME (Ribeiro *et al.*, 1992), sobre a resposta inflamatória foi acrescentado um outro grupo experimental onde os animais receberam captopril (dose diária aproximada de 140 $\mu\text{mol/kg}$) por via oral diluído em água juntamente com o L-NAME. Nesse caso, foi realizado um grupo controle onde os animais receberam apenas captopril (mesma dose).

Finalmente, selecionamos um outro modelo de hipertensão arterial para compararmos com a hipertensão induzida pelo L-NAME. Nesse caso, utilizamos animais hipertensos 2K-1C (método descrito em 2.5). Dois grupos de animais 2K-1C foram incluídos: um controle que recebeu apenas água e outro que recebeu L-NAME (diluído em água, conforme descrito anteriormente). A pressão arterial sistêmica foi avaliada semanalmente pelo método descrito em 2.6 (Zatz, 1990).

2.8. Reagentes utilizados

λ -Carragenina	Sigma Chemical Co (St. Louis, E.U.A.)
N ^ω -Nitro-L-arginina metil éster	Sigma Chemical Co (St. Louis, E.U.A.)
N ^ω -Nitro-D-arginina metil éster	Bachem (Suíça)
Captopril	Squibb Inc. (E.U.A.)
Pentobarbital sódio (Sagatal)	May & Backer LTD (Dagenham, Inglaterra)
Éter etílico	Chemco Ind. e Com. (Campinas, S.P)
Iloprost	Schering AG (Alemanha)

2.9. Análise estatística dos dados

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). O teste *t* não pareado de Student foi usado para avaliação estatística dos dados considerando-se $p < 0.05$ como significativo. Em alguns casos, os resultados foram apresentados como área sob a curva de edema em função do tempo (ml.h), utilizando o método trapezoidal (ASC) para cálculo de área.

3. RESULTADOS

3.1. Tratamento agudo

3.1.1. Edema de pata

A administração subcutânea na região plantar de L-NAME (0.15-1.0 $\mu\text{mol/pata}$, n=10) promoveu uma inibição dose-dependente no edema de pata induzido pela carragenina, sendo que o efeito inibitório máximo foi observado na segunda e terceira hora (Figura 1). De maneira semelhante, a administração endovenosa de L-NAME (35-100 $\mu\text{mol/kg}$, n=20), imediatamente antes da injeção subplantar de carragenina, causou uma inibição dose-dependente do edema de pata (Figura 2).

A administração do enantiômero inativo D-NAME não alterou a resposta edematosa induzida pela carragenina quando administrado pelas vias subcutânea na região plantar (1.0 $\mu\text{mol/pata}$, n=5; Figura 1) ou endovenosa (100 $\mu\text{mol/Kg}$, n=5; Figura 2).

3.1.2. Permeabilidade vascular

A injeção subplantar de carragenina (1 mg/pata) aumentou significativamente ($p < 0.05$) o extravasamento de azul de Evans para o espaço extravascular refletindo, desse modo, acentuada exudação de albumina plasmática para o espaço intersticial. Como ilustrado na Figura 3, a administração endovenosa de L-NAME (100 $\mu\text{mol/kg}$) imediatamente antes da injeção subplantar de carragenina, causou uma redução significativa do extravasamento de proteínas plasmáticas (n=10, $p < 0.01$). Por outro lado, a injeção subplantar de L-NAME (1.0 $\mu\text{mol/pata}$) não modificou significativamente o extravasamento de proteínas (n=10; Figura 3).

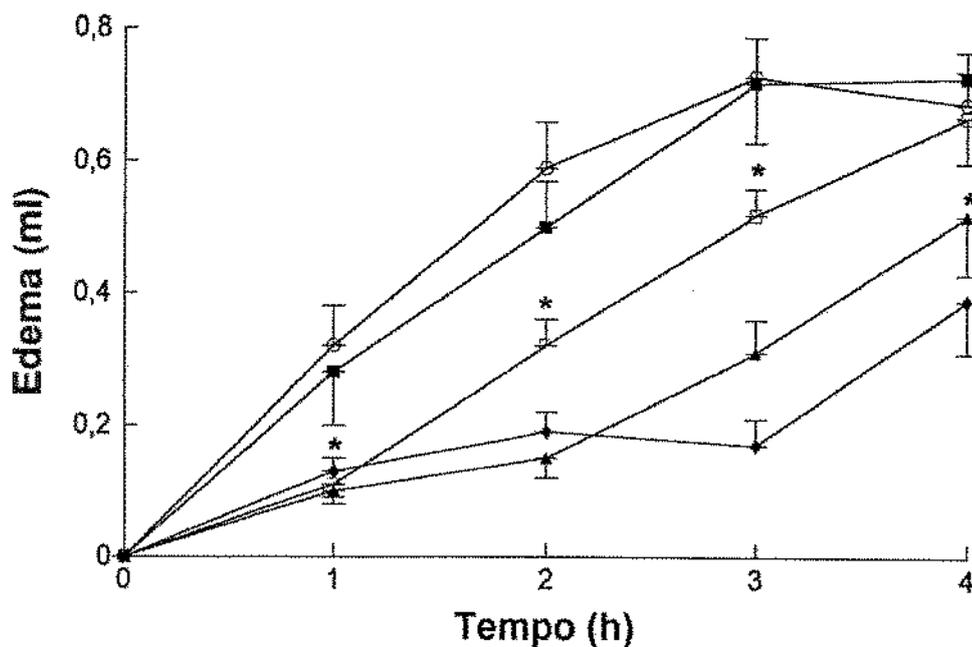


Figura 1. Efeito da injeção subplantar de L-NAME no edema de pata induzido por carragenina (1mg/pata). O L-NAME foi co-injetado com carragenina nas doses de 0.15 (□), 0.35 (▲) e 1.0 μmol/pata (◆). D-NAME foi co-injetado com carragenina na dose de 1.0 μmol/pata (■). Animais controles (○) foram injetados com carragenina (0.1 ml) e salina na pata contra-lateral. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada ponto da curva representa a média de cinco (D-NAME) e dez (L-NAME) ratos. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente carragenina.

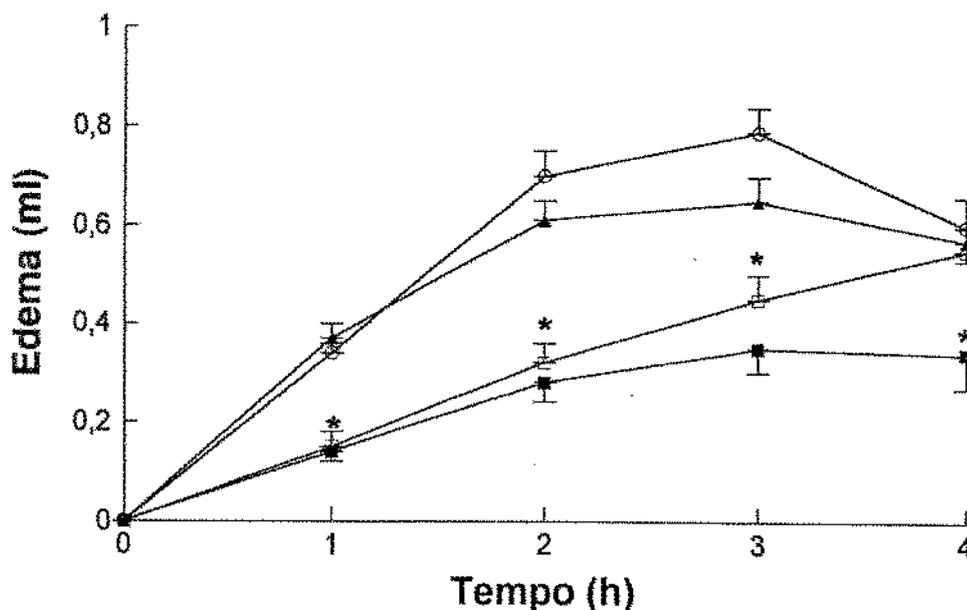


Figura 2. Efeito da administração endovenosa de L-NAME no edema de pata induzido por carragenina (1mg/pata). L-NAME foi injetado nas doses de 35 (□) e 100 (■) $\mu\text{mol/kg}$ imediatamente antes da injeção subplantar de carragenina. D-NAME foi injetado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ antes da injeção de carragenina (▲). Animais controles (O) foram injetados com salina (0.5 ml) antes da injeção de carragenina. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada ponto da curva representa a média de cinco (D-NAME) e vinte (L-NAME) ratos. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam carragenina e salina.

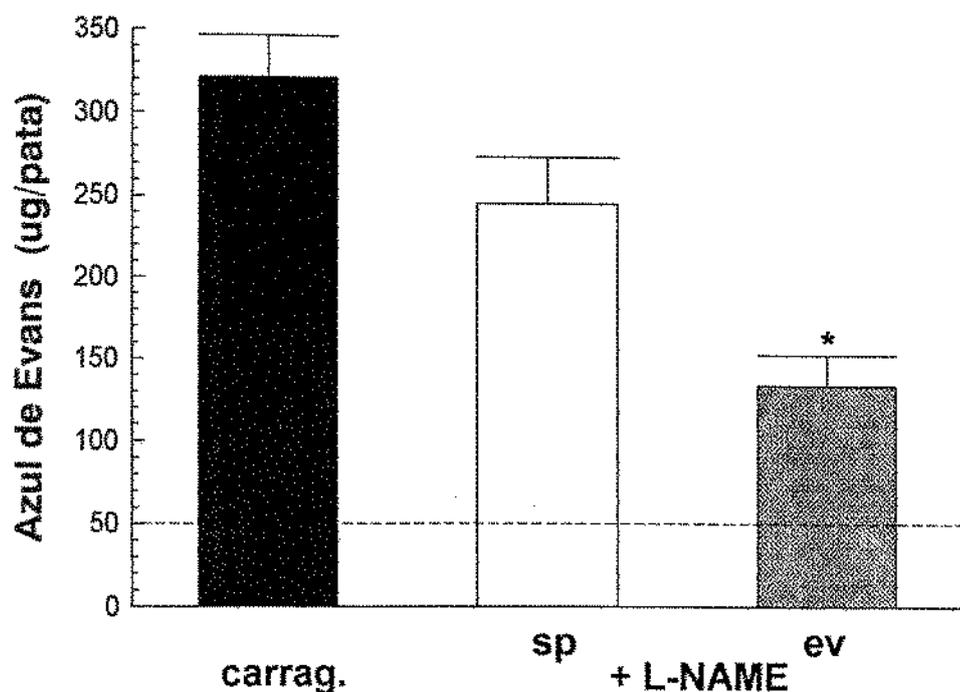


Figura 3. Efeito da injeção subplantar (sp) e endovenosa (ev) do L-NAME na permeabilidade vascular induzida por carragenina (1 mg/pata). O L-NAME foi co-injetado com carragenina na dose de 1 $\mu\text{mol/pata}$ (coluna em branco) e injetado na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ (coluna em bolas) imediatamente antes da injeção subplantar de carragenina. A linha tracejada representa a permeabilidade da pata injetada com salina. A permeabilidade está expressa como aumento no extravasamento de azul de Evans ($\mu\text{g/pata}$) comparado ao extravasamento basal. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de dez ratos. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente carragenina (coluna em preto).

3.1.3. Efeito do iloprost (análogo estável da prostaciclina)

A Figura 4 mostra que a administração subcutânea na região plantar de iloprost (0.3 nmol/pata; n=5), uma hora após a injeção de carragenina, potencializou de modo significativo o edema de pata da segunda à quarta hora, em relação ao grupo controle que recebeu salina. Os valores de ASC foram de 3.5 ± 0.6 e 5.1 ± 0.5 ml.h ($p < 0.05$) para animais controles e injetados com iloprost, respectivamente. Nessa dose de iloprost, verificamos que o mesmo reverteu a inibição do edema causada pela administração endovenosa de L-NAME (100 μ mol/Kg). É importante ressaltar que a injeção individual de iloprost não induz edema de pata (Figura 4).

3.1.4. Pleurisia

A injeção de carragenina na cavidade pleural dos animais induziu infiltração de leucócitos dependente da dose e do tempo (n=15, Tabela 1). Para estudar os efeitos do L-NAME (e D-NAME) sobre a migração leucocitária induzida pela carragenina na cavidade pleural, selecionamos a dose de 0.5 mg de carragenina /cavidade e o tempo de quatro horas após a injeção intrapleural deste agente, onde obtivemos os resultados satisfatórios para avaliarmos o possível efeito deste inibidor de NO.

A administração intrapleural de L-NAME (3 e 10 μ mol/cavidade, n=6), concomitante à injeção de carragenina, inibiu de maneira significativa ($p < 0.05$) e dependente da dose a migração leucocitária (Figura 5) o qual não foi acompanhada por redução do número de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares (n=6, Figura 6).

Resultados semelhantes foram obtidos com a administração endovenosa de L-NAME. Nas doses de 35 e 100 μ mol/kg (n=6), o L-NAME reduziu de modo dose-dependente a migração leucocitária induzida pela carragenina (Figura 7). A contagem diferencial de células não mostrou redução da migração de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares (Figura 8).

A injeção intrapleural (10 μ mol/cavidade, n=5, Figura 5) ou endovenosa (350 μ mol/kg, n=5) de D-NAME não modificou significativamente a migração celular induzida pela carragenina (controle: 53.7 ± 6.4 e tratado: $48.8 \pm 10.5 \times 10^6$ células/cavidade, n=5).

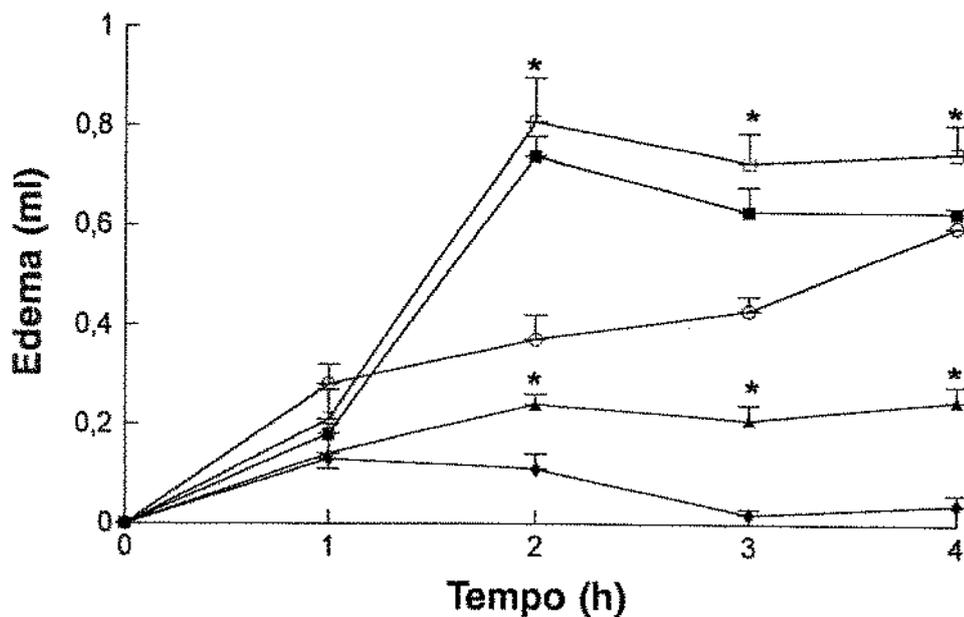


Figura 4. Efeito do iloprost sobre a inibição causada pelo L-NAME no edema de pata induzido por carragenina. O L-NAME foi injetado endovenosamente na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ imediatamente antes da injeção de carragenina (\blacktriangle) ou iloprost (\blacksquare). O grupo controle (\circ) recebeu somente carragenina. O iloprost foi injetado na dose de 0.3 nmol/pata sozinho (\blacklozenge) e 1h após a injeção subplantar de carragenina (\square). O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata comparado ao volume inicial. Cada ponto representa a média de cinco ratos. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0.05$, em relação aos animais controles (não injetados com iloprost).

Tabela 1. Formação de exudato pleural e infiltração de leucócitos induzida por carragenina. A contagem de leucócitos (células $\times 10^6$ /cavidade) e exudato pleural foram avaliados de 2 a 6 horas após a injeção intrapleural de carragenina. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. para quinze animais.

Carrag. (mg/cav)	Leucócitos ($\times 10^6$ cels/cav)		
	Tempo (h)		
	2	4	6
0.1	n.d.	10.8 \pm 1.0	n.d.
0.5	12.2 \pm 4.7	43.3 \pm 6.7	71.0 \pm 7.5
1.0	n.d.	75.8 \pm 9.4	n.d.

Carrag. (mg/cav)	Exudato Pleural (ml)		
	Tempo (h)		
	2	4	6
0.1	n.d.	0.17 \pm 0.11	n.d.
0.5	n.d.	0.74 \pm 0.11	0.82 \pm 0.17
1.0	n.d.	1.14 \pm 0.19	n.d.

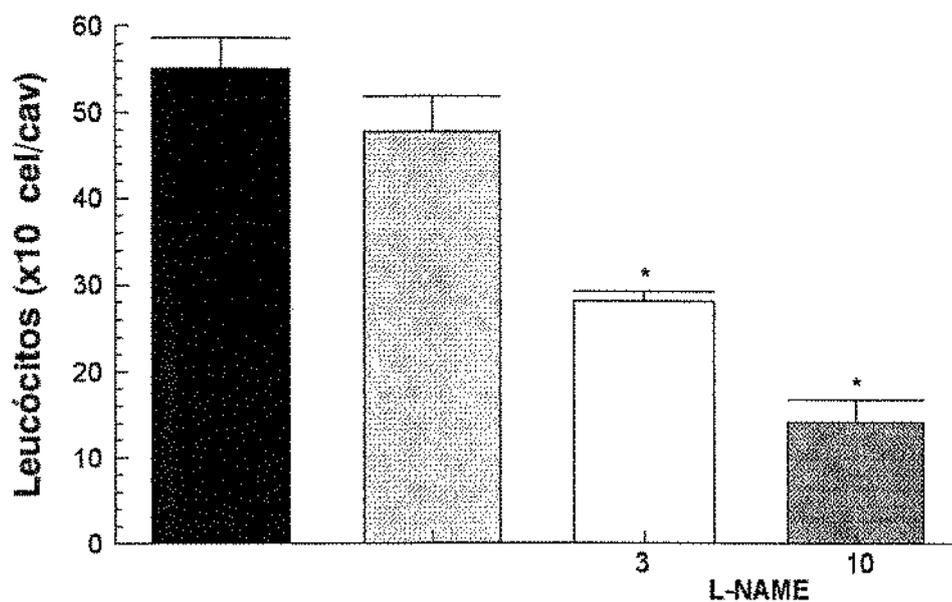


Figura 5. Efeito de L-NAME na migração leucocitária induzida por carragenina (0.5 mg/cavidade). O L-NAME foi co-injetado com carragenina nas doses de 3 e 10 $\mu\text{mol/cavidade}$. O D-NAME foi co-injetado com carragenina na dose de 10 $\mu\text{mol/cavidade}$ (coluna com pontilhados). Os resultados estão expressos como número total de leucócitos ($\times 10^6/\text{cavidade}$). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. para seis (L-NAME) e cinco (D-NAME) ratos. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente carragenina (coluna em preto).

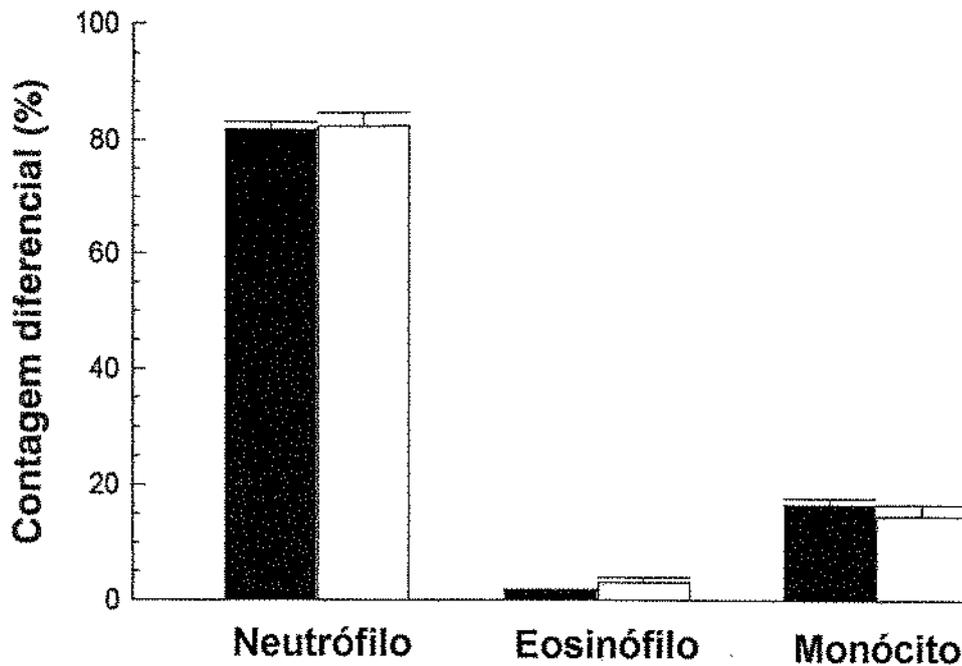


Figura 6. Efeito de L-NAME (intrapleural) na migração diferencial de células induzida por carragenina (0.5 mg/cavidade). O L-NAME foi co-injetado com carragenina na dose de 3 μ mol/cavidade. Os resultados estão expressos como contagem diferencial de células em porcentagem (%). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de seis animais, controles (colunas em preto) e tratados (colunas em branco).

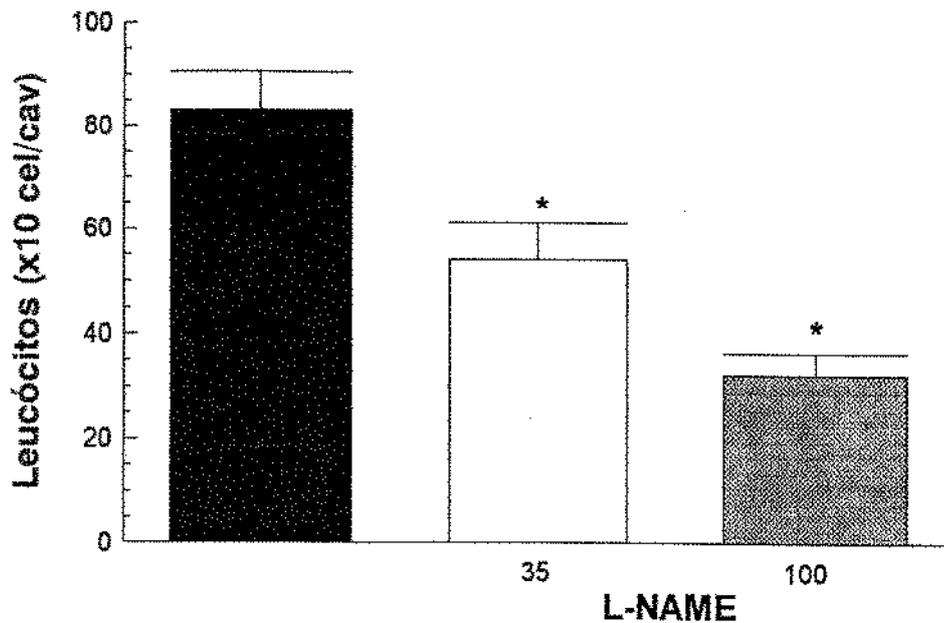


Figura 7. Efeito do L-NAME na migração leucocitária induzida por carragenina (0.5 mg/cavidade). O L-NAME foi injetado por via endovenosa nas doses de 35 e 100 $\mu\text{mol/kg}$ imediatamente antes da injeção intrapleural de carragenina. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de seis ratos. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente carragenina (coluna em preto).

3.2 Tratamento crônico

O tratamento crônico com L-NAME por duas ou quatro semanas não promoveu alteração significativa no peso corporal dos animais (Tabela 2).

3.2.1 Pressão arterial sistêmica

A administração por via oral de L-NAME (aproximadamente 20 mg/rato/dia) diluído em água, por duas ou quatro semanas, produziu elevação significativa da pressão arterial dos animais (Figura 9). A hipertensão máxima causada pelo L-NAME foi atingida na segunda semana de tratamento alcançando valores da ordem de 150-170 mmHg. Por outro lado, o tratamento crônico com D-NAME (mesma dose), por duas ou quatro semanas (n= 20), não alterou significativamente a pressão arterial dos animais (Figura 9).

Animais tornados hipertensos por oclusão da artéria renal esquerda (2K-1C, n=24) apresentaram níveis elevados de pressão arterial comparáveis àqueles obtidos com o L-NAME (Figura 9). A diluição de L-NAME (aproximadamente 75 μ mol/rato/dia) na água dos animais hipertensos 2K-1C não causou uma potencialização da pressão arterial; ao contrário, estes animais apresentaram uma discreta (porém não significativa) redução da pressão arterial (Figura 9).

A diluição de captopril (aproximadamente 140 μ mol/kg/dia, n=20) na água de animais controles normotensos não alterou de modo significativo a pressão arterial dos mesmos. Entretanto, o captopril foi capaz de prevenir a hipertensão induzida por L-NAME por duas ou quatro semanas (Figura 9).

3.2.2 Edema de pata

Conforme ilustrado na Figura 10, o tratamento crônico dos animais com L-NAME por duas semanas causou uma redução significativa do edema de pata induzido pela carragenina, especialmente na segunda e terceira hora. Os valores da área sob a curva (0-4 h) foram respectivamente de 2.6 ± 0.2 e 1.7 ± 0.1 ml.h para animais controles e tratados (n=15, $p < 0.01$). O grupo de animais

tratados com D-NAME no mesmo período de tempo não mostrou redução da resposta edematogênica (2.4 ± 0.4 ml.h; Figura 10).

Conforme ilustrado na Figura 11, o tratamento crônico com L-NAME por quatro semanas também causou uma inibição significativa da resposta edematogênica, quando comparado ao tratamento de duas semanas. Os valores de área sob a curva foram, respectivamente, de 3.2 ± 0.3 e 1.6 ± 0.2 ml.h para animais controles e tratados, n=15.

3.2.3 Permeabilidade vascular

Nos animais tratados com L-NAME por duas e quatro semanas, a permeabilidade vascular (avaliada pelo extravasamento de azul de Evans), foi medida quatro horas após a injeção subplantar de carragenina. As patas contralaterais injetadas com salina foram utilizadas como controles. As Figuras 10 e 11 mostram que, embora o tratamento crônico com L-NAME tenha reduzido significativamente o edema de pata, o mesmo não afetou significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas (n=15).

Tabela 2. Efeito da administração crônica de L-NAME, L-NAME + captopril e somente captopril, na evolução ponderal dos animais. Os animais receberam o L-NAME, L-NAME + captopril e o captopril diluído em água por duas e quatro semanas, animais controles receberam somente água. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m.

	Peso (g)	
	2 semanas	4 semanas
controle	163 \pm 2.5	231 \pm 3.5
L-NAME	152.2 \pm 0.3	216 \pm 6.0
L-NAME + cap.	161.6 \pm 5.2	222 \pm 4.9
captopril	157.2 \pm 5.2	222 \pm 4.9

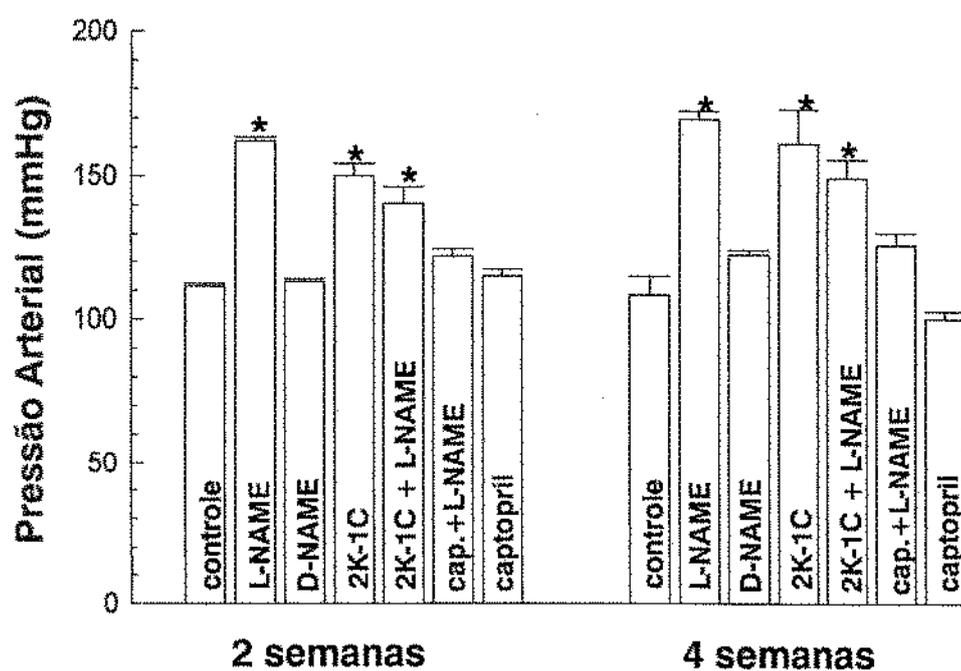


Figura 9. Medida de pressão arterial (mmHg) avaliada em duas e quatro semanas de tratamento crônico. L-NAME e D-NAME (aproximadamente 75 $\mu\text{mol}/\text{rato}/\text{dia}$) foram diluídos em água por duas e quatro semanas. Animais controles receberam somente água. Também foram avaliados a adição de captopril individualmente (140 $\mu\text{mol}/\text{rato}/\text{dia}$) ou concomitantemente ao L-NAME. Também foram avaliados os níveis de pressão arterial de animais 2K-1C e de animais 2K-1C tratados com L-NAME. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 10-40 animais. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente água.

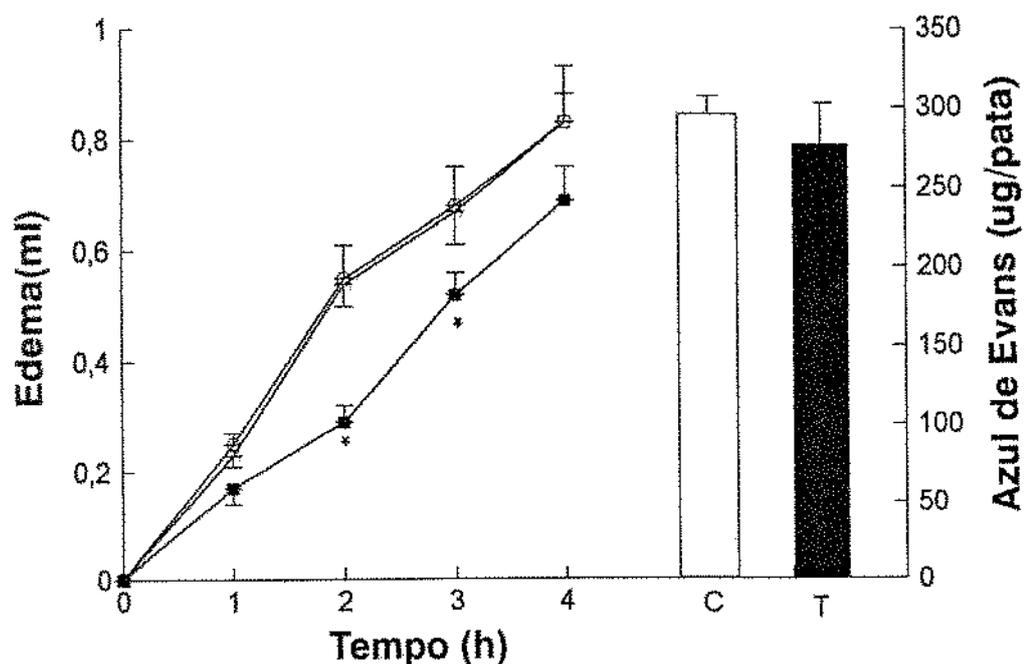


Figura 10. Efeito do tratamento crônico (duas semanas) com L-NAME e D-NAME sobre o edema de pata e permeabilidade vascular induzido por carragenina (1 mg/pata). Os animais tratados com L-NAME (■) ou D-NAME (□), aproximadamente 75 $\mu\text{mol}/\text{rato}/\text{dia}$, foram submetidos a injeção subplantar de carragenina. O extravasamento de proteínas plasmáticas (colunas à direita do gráfico) foi avaliado na quarta hora do edema. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata comparado com volume inicial. A permeabilidade está expressa como concentração de azul de Evans/pata. As barras verticais representam a média \pm e.p.m. de quinze animais. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente água (O). C=controle; T=tratados com L-NAME.

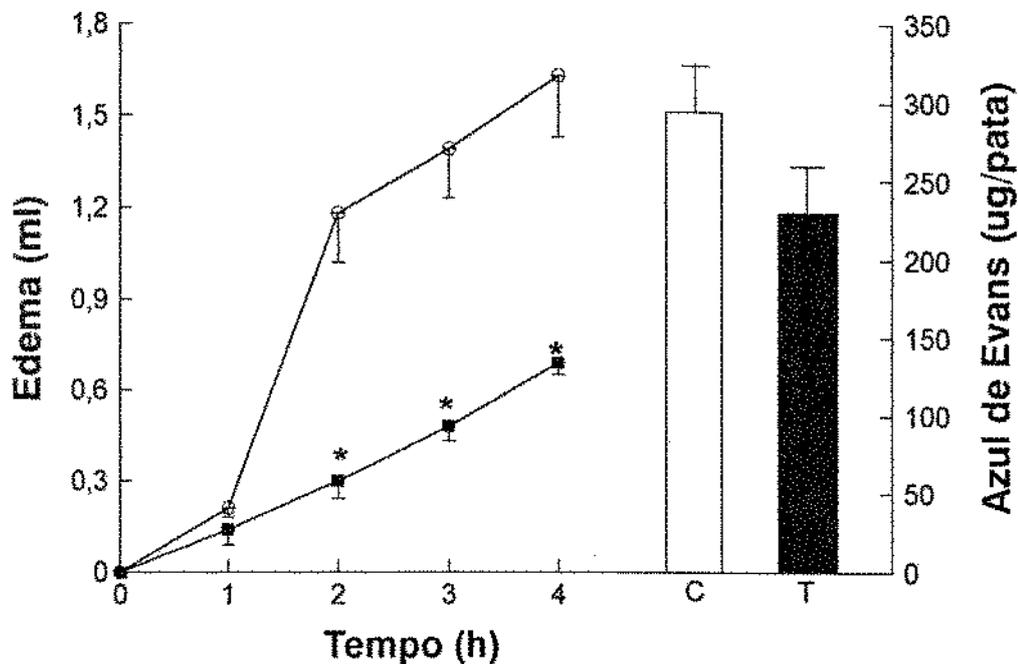


Figura 11. Efeito do tratamento crônico (quatro semanas) com L-NAME sobre o edema de pata e permeabilidade vascular induzido por carragenina (1 mg/pata). Os animais tratados com L-NAME (■) (aproximadamente 75 µmol/rato/dia) foram submetidos a injeção suplantar de carragenina. O extravasamento de proteínas plasmáticas (colunas à direita do gráfico) foi avaliado na quarta hora do edema. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata comparado ao volume inicial. A permeabilidade vascular está expressa como concentração de azul de Evans/pata. As barras verticais representam a média ± e.p.m. de quinze animais. * $p < 0.05$, em relação aos animais que receberam somente água (O). C=controle; T=tratados com L-NAME.

3.2.4 Efeito do iloprost

A Figura 12 mostra que a administração subcutânea na região plantar de iloprost (0.3 nmol/pata, n=10), uma hora após a injeção de carragenina, potencializou a resposta edematogênica ($p < 0.05$), conforme demonstrado anteriormente. Observa-se ainda nesta figura que o iloprost reverteu significativamente a inibição causada pelo tratamento crônico por quatro semanas com L-NAME.

3.2.5 Efeito do captopril

A Figura 13 mostra que animais tratados com captopril (aproximadamente 140 $\mu\text{mol/kg/dia}$, n=10) por quatro semanas apresentaram resposta edematogênica semelhante que animais controles (4.4 ± 0.4 e 5.1 ± 0.2 ml.h; área sob a curva para animais controles e tratados com captopril, respectivamente). A figura mostra ainda que o captopril não modificou de modo significativo a inibição causada pelo tratamento crônico com L-NAME (2.3 ± 0.4 e 3.4 ± 0.5 ml.h, ASC para animais tratados com L-NAME e com L-NAME + captopril, respectivamente). Na segunda hora, por exemplo, as percentagens de inibição causadas pelo L-NAME em animais controles e tratados com captopril foram, respectivamente, de 56.0 ± 7.0 % e 46.4 ± 8.4 %. Na terceira hora, foram de 52.6 ± 9.1 % e 33.7 ± 9.9 % ($p < 0.05$), respectivamente.

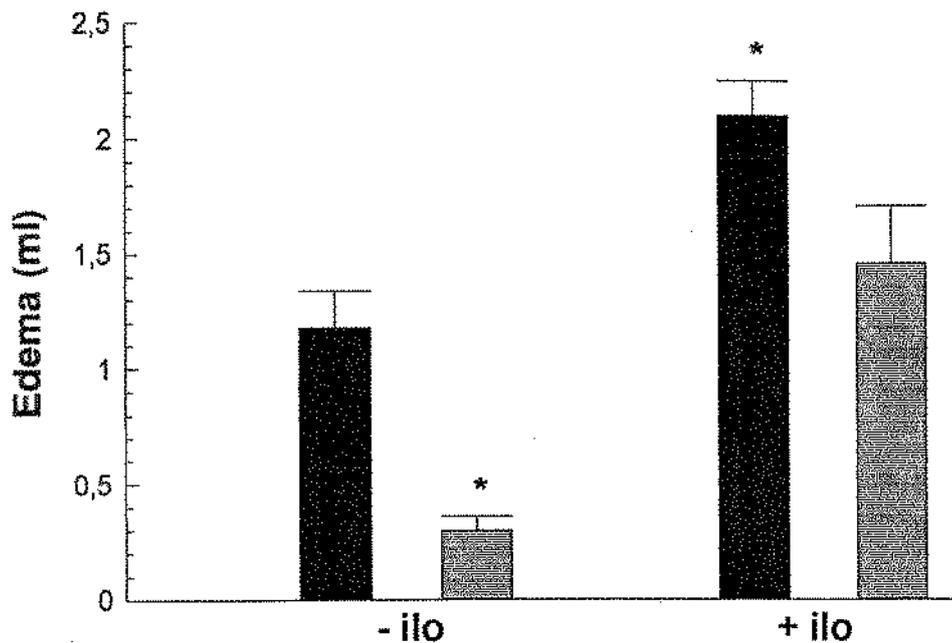


Figura 12. Efeito do iloprost sobre a inibição causada pelo tratamento crônico com L-NAME (quatro semanas) no edema de pata induzido por carragenina (1 mg/pata). O iloprost (0.3 nmol/pata) foi injetado na pata de animais controles (colunas cheias) e tratados com L-NAME (colunas com listas) 1h após a injeção subplantar de carragenina. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata comparado ao volume inicial. Cada coluna representa a média de dez ratos \pm e.p.m. * $p < 0.05$ por comparação com os valores obtidos nos animais controles.

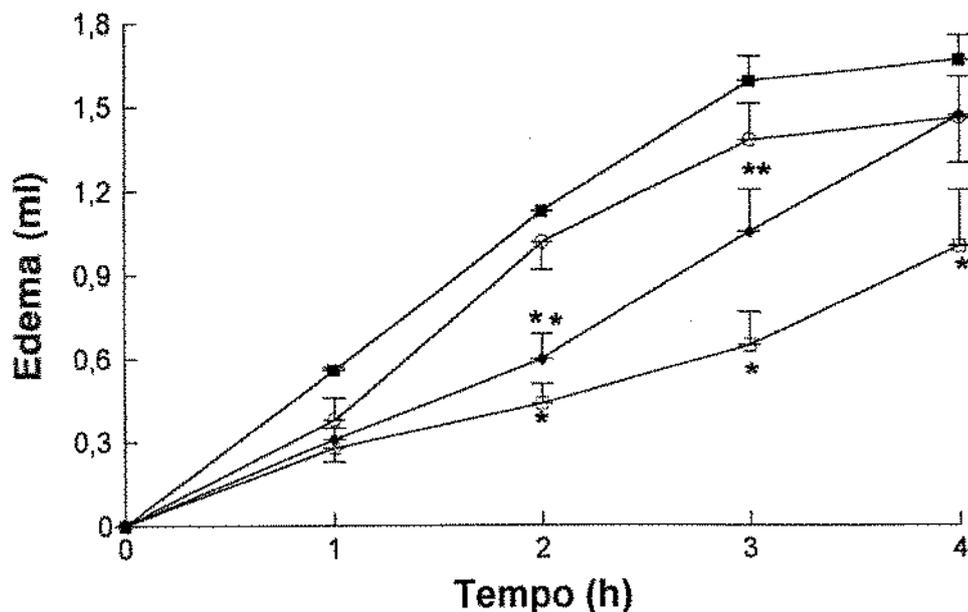


Figura 13. Efeito do captopril sobre a inibição causada por L-NAME no edema de pata induzido por carragenina (1 mg/pata). Captopril (aproximadamente 140 $\mu\text{mol}/\text{rato}/\text{dia}$) foi administrado por via oral diluído em água individualmente ou em associação com L-NAME (aproximadamente 75 $\mu\text{mol}/\text{rato}/\text{dia}$; quatro semanas). Os símbolos (O), (■), (□) e (◆) representam o grupo controle, grupo tratado apenas com captopril, grupo tratado com L-NAME e grupo tratado com L-NAME + captopril, respectivamente. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata em relação ao volume basal. Cada ponto da curva representa a média de dez ratos. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0.05$ em relação aos animais controles sem tratamento e ** $p < 0.05$ em relação aos animais que receberam apenas captopril.

3.2.6 Efeito do L-NAME em animais 2K-1C

A Figura 14 mostra que animais 2K-1C apresentaram uma resposta edematogênica significativamente maior do que animais controles normotensos. A área sob a curva para ambos os grupos foi de 2.6 ± 0.3 e 3.5 ± 0.3 ml.h para animais controles e hipertensos, respectivamente ($p < 0.05$, $n=10$). Observamos ainda que a inibição causada pelo tratamento crônico com L-NAME (quatro semanas) no grupo de animais hipertensos 2K-1C foi de magnitude similar ao grupo controle. A área sob a curva para ambos os grupos foi de 1.4 ± 0.2 e 1.3 ± 0.1 ml.h para animais controles e animais 2K-1C tratados com L-NAME, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos pelo tratamento crônico com L-NAME por duas semanas (dados não apresentados, $n=10$).

3.2.7 Pleurisia

A injeção de carragenina na cavidade pleural de animais cronicamente tratados com L-NAME por duas ou quatro semanas não alterou de modo significativo a migração leucocitária quando comparado aos animais controles (Tabela 3). Com relação à contagem diferencial, verificamos que animais tratados com L-NAME por quatro semanas não apresentaram inibição na migração de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares ($n=6$, Tabela 3).

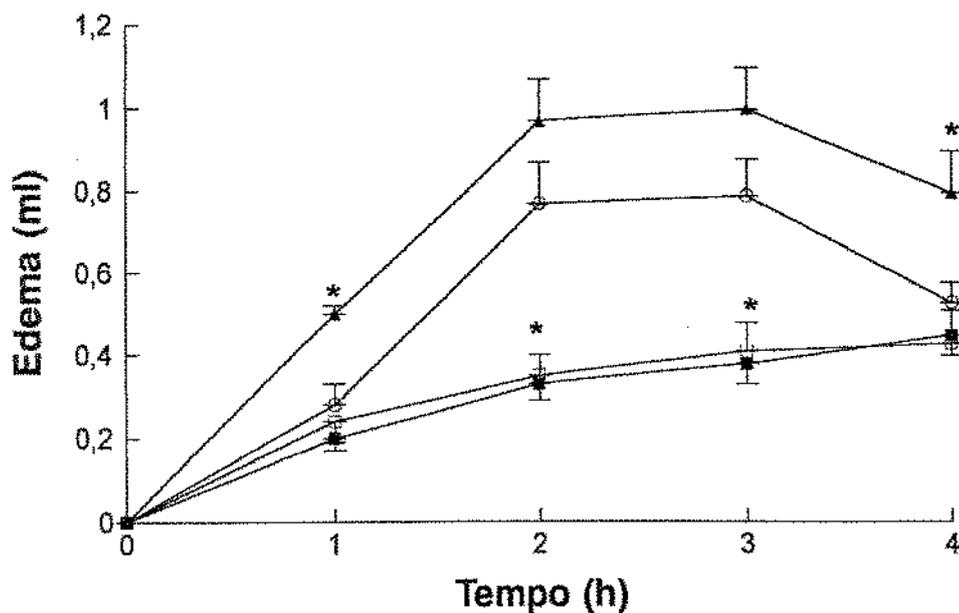


Figura 14. Efeito da hipertensão (ratos 2K-1C) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 mg/pata). O edema de pata em animais 2K-1C (▲) foi induzido em um tempo de quatro semanas após a cirurgia. L-NAME (75 $\mu\text{mol/rato/dia}$) foi diluído na água dos animais 2K-1C (■) e na água dos animais sham (□) por quatro semanas. O edema está expresso como aumento no volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada ponto da curva representa a média de dez ratos. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0.05$, em relação aos animais normotensos (○).

Tabela 3. Infiltração de leucócitos e contagem diferencial de células em animais tratados cronicamente com L-NAME (ou D-NAME). Contagem total (células $\times 10^6$ /cavidade) e diferencial de células (%) foram avaliadas quatro horas após a injeção intrapleural de carragenina (0.5 mg/cavidade). Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. de seis animais.

Tratamento	LEUCÓCITOS (x 10 ⁶ /ml)		DIFERENCIAL (%)		
	2 semanas	4 semanas	Neutro	Eosino	Mono
Controle	78.0 + 8.1	64.6 + 5.2	72.6 \pm 3.8	2.0 \pm 0.03	26.2 \pm 3.8
L-NAME	68.8 + 3.6	60.8 + 5.9	76.2 \pm 0.9	2.4 \pm 0.6	21.4 \pm 0.6
D-NAME	77.0 + 10.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = não determinado

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a administração aguda ou crônica do inibidor da síntese de NO, L-NAME, inibe a resposta edematogênica induzida por carragenina em pata de ratos, indicando que o NO endógeno modula a formação local de edema. A redução da resposta edematogênica causada pelo L-NAME é de fato devido à inibição da síntese de NO visto que o enântiômero inativo D-NAME não apresentou efeito inibitório.

Atualmente, é aceito que o NO é produzido localmente em diversos leitos vasculares para manter o tônus dilatador da microvasculatura (Moncada *et al.*, 1992). Utilizando preparações e espécies animais diferentes, alguns autores têm demonstrado que inibidores da síntese de NO inibem a resposta edematogênica induzida por diversas substâncias. Entretanto, o mecanismo pelo qual o NO exerce este efeito ainda não está completamente elucidado e, em alguns casos, é até controverso.

Com relação à administração aguda de L-NAME, verificamos neste trabalho que o mesmo inibe o edema de pata quando injetado pelas vias subcutânea na região plantar ou endovenosa. Esta inibição é prevenida quando se faz a co-injeção de um potente vasodilatador, como o iloprost (Skuballa *et al.*, 1988). Isto indica que o efeito inibitório do L-NAME é devido a uma redução do fluxo sanguíneo local (vasoconstrição) acarretando menor formação de edema. O resultado com o iloprost elimina a possibilidade que o L-NAME esteja promovendo redução de edema por inibir diretamente o aumento de permeabilidade vascular. Resultados semelhantes foram obtidos para o edema de pata induzido por poliarginina (Antunes *et al.*, 1990). Neste caso, o iloprost também reverteu significativamente a inibição causada pela administração aguda de L-NMMA, indicando que a redução de edema ocorreu por vasoconstrição local. Esta hipótese é ainda reforçada pelos estudos de Teixeira *et al.*, (1993) *in vivo* em pele de cobaia. Estes autores demonstraram que alguns vasodilatadores (nitroprussiato de sódio e prostaglandina E₁) também são capazes de reverter o efeito inibitório do L-NAME tanto sobre o fluxo sanguíneo como sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por bradicinina. Em pele de coelho também foi demonstrado que o nitroprussiato de sódio reverte parcialmente o efeito inibitório do L-NAME sobre o extravasamento de albumina induzido por histamina (Pedroso-Mariani *et al.*, 1995).

Na microcirculação cutânea de ratos, o L-NMMA e L-NAME reduzem o fluxo sanguíneo basal e/ou a formação de edema induzido por substância P (Hughes *et al.*, 1990), carragenina, dextran (Ialenti *et al.*, 1992), bradicinina, serotonina e composto 48/80 (Antunes *et al.*, 1992). Em todos estes trabalhos, é sugerido que a redução de edema se deve sobretudo à redução de fluxo sanguíneo. De fato, a injeção local de vasoconstritores tais como catecolaminas (O'Duffy & Chahl, 1979) e endotelina-1 (Brain *et al.*, 1989; Chandler *et al.*, 1990) inibe a formação de edema induzido por diversos agentes.

A possibilidade do NO atuar diretamente em nível de permeabilidade endotelial tem sido também investigada. Em preparações de bochecha de hamster *in vivo* foi demonstrado que o L-NAME inibe, de maneira dose-dependente, o extravasamento de proteínas induzido por bradicinina e adenosina di-fosfato (Mayhan, 1992). Neste caso, o autor concluiu que tal inibição se deve a uma redução de permeabilidade endotelial e não a uma redução de fluxo sanguíneo local.

Ao contrário destes estudos onde o L-NAME apresenta uma resposta "anti-inflamatória", em outros leitos vasculares tais como vias aéreas superiores, fígado, baço, pâncreas, rim, estômago e duodeno de ratos (Filep & Foldes-Filep, 1993), circulação mesentérica de gato (Kubes *et al.*, 1991), circulação coronariana de rato (Filep *et al.*, 1993) e em vênulas mesentéricas de rato (Kurose *et al.*, 1993), a administração aguda de L-NAME "per se" promove um acentuado extravasamento de albumina, indicando agora que o NO apresenta um papel protetor sobre o endotélio, minimizando a perda de fluídos e proteínas.

À semelhança do tratamento agudo, o tratamento crônico com L-NAME, por duas e quatro semanas, também determinou inibição significativa do edema de pata induzido pela carragenina. O efeito inibitório do L-NAME foi revertido pelo iloprost, indicando que, sob tratamento crônico, a inibição do edema deva também ocorrer por redução do fluxo sanguíneo local.

Neste trabalho, nós confirmamos que a administração crônica de inibidores da síntese de NO acarreta acentuada hipertensão aos animais como primeiramente descrito (Baylis *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 1992). Atualmente, outros grupos de pesquisadores vem utilizando o modelo de administração crônica de L-NAME como novo modelo de hipertensão e/ou cardiopatias (Pollock *et al.*, 1993; Jover *et al.*, 1993).

A hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com L-NAME em ratos é mediada principalmente pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona visto que o tratamento dos animais com losartan (antagonista de receptores de angiotensina II) previne várias das alterações hemodinâmicas induzidas pelo L-NAME tais como a hipertensão, a redução do ritmo de filtração glomerular e o aumento da resistência vascular renal (Ribeiro *et al.*, 1992). Entretanto, animais hipertensos 2K-1C não apresentaram inibição da resposta edematogênica induzida por carragenina indicando, provavelmente, que níveis circulantes elevados de angiotensina II não é um fator importante responsável pela modulação do fluxo sanguíneo microvascular na pata do rato. Além disso, os animais tratados com o inibidor da enzima cininase II, captopril, apresentaram níveis de pressão arterial praticamente normais, porém a resposta edematogênica em presença do L-NAME não foi alterada, ou seja, o captopril previne a hipertensão mas não reverte significativamente a inibição do edema de pata causada pelo tratamento crônico com L-NAME. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a redução do fluxo sanguíneo pelo L-NAME não é um fator que dependa de elevação de pressão arterial, mas que provavelmente reflete ausência local de produção de NO a nível de microcirculação que irriga a pata do animal.

O edema de pata nos animais hipertensos 2K-1C foi significativamente maior do que nos animais controles normotensos. Curiosamente, animais hipertensos 1K-1C apresentam níveis sanguíneos de cininas aumentadas quando comparados aos animais normotensos (Salgado *et al.*, 1986). Visto que cininas estão envolvidos no edema de pata induzido por carragenina (Di Rosa *et al.*, 1971), é possível que o aumento da resposta edematogênica observado nestes animais seja decorrente de níveis elevados das cininas. Isto também explicaria o discreto aumento do edema observado nos animais tratados cronicamente com captopril.

Nossos resultados demonstram ainda que embora a injeção subplantar e endovenosa de L-NAME tenha causada semelhante redução do volume da pata (medido em ml), o extravasamento de proteínas plasmáticas não apresentou o mesmo padrão de resposta, ou seja, o tratamento endovenoso reduziu o extravasamento de proteínas plasmáticas enquanto o mesmo não foi observado com o tratamento subplantar. Com relação ao tratamento crônico com L-NAME, observamos que, apesar do mesmo causar uma inibição do edema de pata também não alterou o extravasamento de proteínas para o espaço intersticial. É possível que esta discrepância (inibição do edema não acompanhado por uma inibição concomitante de extravasamento proteico) seja decorrente de uma cinética diferente para os dois eventos, conforme o protocolo empregado.

A resposta inflamatória induzida pela carragenina é dependente de leucócitos circulantes (Spector & Willoughby, 1959; Di Rosa *et al.*, 1971). Leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares sintetizam NO (Rimele *et al.*, 1988; Salvemini *et al.*, 1989) e acredita-se que tal mediador possua um efeito inibitório sobre a aderência e migração entre leucócitos e células endoteliais em nível de vênulas pós-capilares (Kubes *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1993). Na microcirculação cutânea de cobaias *in vivo*, Teixeira *et al.*, 1993, verificava que a administração subcutânea de L-NAME promovia uma inibição do acúmulo de neutrófilos e eosinófilos induzidos por fator ativador de plaquetas (PAF), antígenos (gamaglobulina bovina) e zimosan. Esta inibição era revertida pela co-injeção de vasodilatadores tais como o nitroprussiato de sódio (doador de NO) e prostaglandina E₁, indicando que a ação inibitória do L-NAME deveu-se a uma redução do tônus vasodilatador naquele sítio microcirculatório. Além disso, o L-NMMA foi também capaz de inibir a quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro* induzida por fMLP, C5a des Arg e LTB₄. Neste caso, a L-arginina, o nitroprussiato de sódio e 8-bromo-GMPc atenuaram a resposta inibitória do L-NMMA (Belenky *et al.*, 1993). Estes resultados indicam a priori que o NO regula a quimiotaxia de leucócitos *in vivo*. Por outro lado, em preparações de mesentério de gato, o L-NMMA e o L-NAME causaram um aumento acentuado tanto na adesão quanto na migração de leucócitos (medidos por técnicas de microscopia intravital; Kubes *et al.*, 1991). Estes autores concluíram que o NO é um inibidor endógeno da adesão e migração de leucócitos e que na ausência do mesmo ocorre um quadro de inflamação aguda por favorecer ambos os eventos inflamatórios. Resultados semelhantes foram

observados posteriormente pelo mesmo grupo de autores em preparações de vênulas mesentéricas de ratos (Kurose *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que o tratamento agudo com L-NAME reduziu significativamente a migração celular total. Acreditamos que tal efeito seja decorrente de extensa vasoconstrição (isquemia) promovida pelo inibidor de NO acarretando, conseqüentemente, menor perfusão sanguínea no leito microcirculatório pleural. Esta hipótese poderia ser confirmada pela co-injeção de vasodilatadores (nitroprussiato de sódio, iloprost) à semelhança dos trabalhos de Teixeira *et al.*, (1993). No tratamento crônico, onde acreditamos ser mais fidedigno do ponto de vista fisiopatológico, não verificamos inibição significativa da migração celular total provavelmente porque em um mês de tratamento, o animal encontre mecanismos capazes de compensar a redução de fluxo sanguíneo local garantindo o mínimo necessário para o funcionamento do órgão.

5. CONCLUSÕES

1. O óxido nítrico endógeno modula a formação local de edema uma vez que a administração aguda ou crônica de L-NAME (mas não de D-NAME) inibe significativamente o edema de pata de rato induzido por carragenina.

2. O L-NAME atua provavelmente promovendo redução do fluxo sanguíneo local em vez de afetar diretamente a permeabilidade microvascular uma vez que o vasodilatador iloprost reverte a inibição causada pelo L-NAME no edema de pata induzido por carragenina.

3. A redução no fluxo sanguíneo causada pelo L-NAME parece não estar relacionada à hipertensão arterial, pois o captopril previne a hipertensão mas não reverte os efeitos inibitórios do L-NAME no edema de pata. Os animais tornados hipertensos por oclusão da artéria renal (2K-1C) não apresentam redução no edema de pata, indicando, provavelmente, que níveis circulantes elevados de angiotensina II não são os principais componentes que modulam o fluxo sanguíneo microvascular local na pata do rato.

4. O L-NAME não modificou a formação de exudato e migração de leucócitos induzidas por carragenina na cavidade pleural. Isto indica que, provavelmente, o óxido nítrico não modula este fenômeno no leito microcirculatório do rato.

Referências Bibliográficas

- Amelang, E.; Prasad, C.M.; Raymond, R.M. and G.J. Grega, Interactions among inflammatory mediators on edema formation in the canine forelimb, 1981, *Circ. Res.*, **49**: 298-306.
- Antunes, E.; Giraldeho, C.M.M.; Cirino, G. and G. de Nucci, Effects of N^G-monomethyl-L-arginine and its D-enantiomer on rat hind-paw oedema, 1992, In: *Biology of nitric oxide - Physiological and clinical aspects*, ed. S. Moncada, M.A. Marletta, J.B. Hibbs and E.A. Higgs (Portland Press Ltd), 264-266.
- Antunes, E.; Mariano, M.; Cirino, G.; Levi, S. and G. de Nucci, Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema, 1990, *Br. J. Pharmacol.*, **101**: 986-990.
- Baylis, C.; Mitruka, B. and A. Deng, Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage, 1992, *J. Clin. Invest.*, **90**: 278-291.
- Belenky, S.N.; Robbins, R.A.; Rennard, S.I.; Gossman, G.L.; Nelson, K.J. and I. Rubinstein, Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis in vitro, 1993, *J. Lab. Clin. Med.*, **122**: 388-394.
- Boughton-Smith, N.K.; Deakin, A.M.; Follenfant, R.L.; Whittle, B.J.R. and L.G. Garland, Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat, 1993, *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 896-902.
- Brain, S.D.; Crossman, D.C.; Buckley, T.L. and T.J. Williams, Endothelin-1: demonstration of potent effects on the microcirculation of humans and other species, 1989, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**: S147.
- Chahl, L.A.; Interactions of substance P with putative mediators of inflammation and ATP, 1977, *Eur. J. Pharmacol.*, **44**: 45-49.
- Chander, C.L.; Howat, D.W.; Moore, A.R.; Colville-Nash, P.R.; Desai, F.M.; Braquet, P. and D.A. Willoughby, Comparison of endothelin-1 and -3 on models of inflammation, 1990, *Agents Actions*, **29**: 27-29.

- Clancy, R.M.; Leszczynska-Piziak, J. and S.B. Abramson, Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase, 1992, *J. Clin. Invest.*, **90**: 1116-1121.
- Curran, R.D.; Billiar, T.R.; Stuehr, D.J.; Hofmann, K. and R.L. Simmons, Hepatocytes produce nitrogen oxides L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cell, 1989, *J. Exp. Med.*, **170**: 1769-1774.
- Di Rosa, M.; Giroud, J.P. and D.A. Willoughby, Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine, 1971, *J. Path.*, **104**: 15-28.
- Feelisch, M.; Poel, M.; Zamora, R.; Deussen, A. and S. Moncada, Understanding the controversy over the identity of EDRF, 1994, *Nature*, **368**: 62-65.
- Filep, J.G. and E. Foldes-Filep, Modulation by nitric oxide of platelet-activating factor-induced albumin extravasation in the conscious rat, 1993, *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 1347-1352.
- Filep, J.G.; Foldes-Filep, E. and P. Sirois, Nitric oxide modulates vascular permeability in rat coronary circulation, 1993, *Br. J. Pharmacol.*, **108**: 323-326.
- Fortes, Z.B.; Oliveira, M.A.; Scivoletto, R.; Carvalho, M.H.C.; de Nucci, G. and D. Nigro, Nitric oxide release may be involved in the microcirculatory response to acetylcholine, 1990, *Eur. J. Pharmacol.*, **182**: 143-147.
- Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, 1980, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, **288**: 373-376.
- Fukuto, J.M.; Wood, K.S.; Byrns, R.E. and L.J. Ignarro, N^o-Amino-L-arginine: a new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium-dependent relaxation, 1990, *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **168**: 458-465.
- Furlong, B.; Henderson, A.H.; Lewis, M.J. and J.A. Smith, Endothelium-derived relaxing factor inhibits *in vitro* platelet aggregation, 1987, *Br. J. Pharmacol.*, **90**: 687-692.

- Gamse, R. and A. Saria, Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide, 1985, *Eur. J. Pharmacol.*, **114**: 61-66.
- Garthwaite, J.; Charles, S.L. and R. Chess-Williams, Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in brain, 1988, *Nature*, **336**: 385-388.
- Giraldelo, C.M.M.; Zappellini, A.; Muscará, M.N.; De Luca, I.M.S.; Hyslop, S.; Cirino, G.; Zatz, R.; de Nucci, G. and E. Antunes, Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation *in vitro*, 1994, *Eur. J. Pharmacol.*, **16**: 87-93.
- Hughes, S.R.; T.J. Williams and S.D. Brain, Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P, 1990, *Eur. J. Pharmacol.*, **191**: 481-484.
- Ialenti, A.; Iannaro, A.; Moncada, S. and M. Di Rosa, Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide, 1992, *Eur. J. Pharmacol.*, **211**: 177-182.
- Ialenti, A.; Moncada, S. and M. DiRosa, Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide, 1993, *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 701-706.
- Ishii, K.; Chang, B.; Kerwin, J.F.; Huang, Z.J. and F. Murad, N^o-Nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation, 1990, *Eur. J. Pharmacol.*, **176**: 219-223.
- Jover, B.; Herizi, A.; Ventre, F.; Dupont, M. and A. Mimran, Sodium and Angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade, 1993, *Hypertension*, **21**: 944-948.
- Kubes, P.; M., Suzuki and D.N. Granger, Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 4651-4655.
- Kurose, I.; Kubes, P.; Wolf, R.; Anderson, D.C.; Paulson, J.; Miyasaka, M. and D.N. Granger, Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage, 1993, *Circ. Res.*, **73**: 164-171.

- Lykke, A.W.J. and R. Cummings, Inflammation in healing. I. Time course and mediation of exudation in wound healing in the rat, 1969, *Br. J. Exp. Path.*, **50**: 309-318.
- Maggi, C.A.; Barbanti, G.; Turini, D. and S. Giuliani, Effect of N^G- monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG) on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum, 1991, *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1970-1972.
- Marletta, M.A.; Yoon, P.S.; Iyengar, R.; Leaf, C.D. and J.S. Wisnhnok, Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate, 1988, *Biochemistry.*, **27**: 8706-8711.
- May, G.R.; Croock, P.; Moore, P.K. and C.P. Page, The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit, 1991, *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 759-763.
- Mayhan, W.G., Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin, 1992, *Inflammation*, **16**: 295-305.
- McCall, T.B.; Feelisch, M.; Palmer, R.M.J. and S. Moncada, Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells, 1991, *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 234-238.
- McCartney-Francis, N.; Alen, J.B.; Mizel, D.E.; Albina, J.E.; Xie, Q.; Nathan, C.F. and S.M. Wahl, Suppression of Arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, 1993, *J. Exp. Med.*, **178**: 749-754.
- Moncada, S., The L-arginine: nitric oxide pathway, 1992, *Acta Physiol. Scand.*, **145**: 201-227.
- Moore, P.K.; al-Swayeh, A.O.; Chong, N.W.S.; Evans, R.A. and A. Gibson, L-N^G-Nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*, 1990, *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 408-412.

- Murphy, S.; Minor, L.; Welk, G. and D.G Harrison, Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide, 1990, *J. Neurol. Chem.*, **55**: 349-350.
- O'Duffy, G. and L.A. Chahl, Effect of catecholamines on oedema induced by inflammatory agents in the rat, 1979, *Eur. J. Pharmacol.*, **57**: 377-386.
- Palmer, R.M.J.; Rees, D.D.; Ashton, D.S. and S. Moncada, L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation, 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**: 1251-1256.
- Pedroso-Mariani, S.R.; Bizeto, L.; Antunes, E. and G. de Nucci, Dissimilarity between prostaglandin E₁ and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in rabbit skin *in vivo*, 1995, *Prostaglandins*, in press.
- Pollock, D.M.; Polakowski, J.S.; Divish, B.J. and T.J. Opgenorth, Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition, 1993, *Hypertension*, **21**: 660-666.
- Rees, D.D.; Palmer, R.M.J.; Hodson, H.F. and S. Moncada, A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation, 1989, *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 418-424.
- Ribeiro, M.O.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Lovisolio, S.M. and R. Zatz, Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension, 1992, *Hypertension*, **20**: 298-303.
- Rimele, T.J.; Sturn, R.J. and L.M Adams, Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor, 1988, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**: 102-111.
- Salgado, M.C.O.; Rabito, S.F. and O.A. Carretero, Blood kinin in one-kidney, one clip hypertensive rats, 1986, *Hypertension*, **8**[Supl.1]: 110- 113.
- Salvemini, D.; de Nucci, G.; Gryglewski, R. and J. Vane, Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 6328-6332.

- Salvemini, D.; Masini, E.; Anggard, E.; Mannaioni, P.F. and J.R. Vane, Synthesis of nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation, 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**: 596-601.
- Spector, W.G. and D.A. Willoughby, The demonstration of the role of mediators in turpentine pleurisy in rats by experimental suppression of the inflammatory changes, 1959, *J. Patholog. Bact.*, **77**: 1-.
- Skuballa, W.; Raduchel, B. and H. Vorbruggen, Chemistry of stable prostacyclin analogues: synthesis of iloprost, 1987, In *Prostacyclin and its stable analogue iloprost*, eda. R Gryglewski and G Stock, Springer-Verlag: 17-24.
- Stadler, J.; Stefanovic-Racic, M.; Billiar, T.R.; Curran, R.D.; McIntyre, L.A.; Georgescu, H.I., Simmons, R.L. and C.H. Evans, Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide, 1991, *J. Immunol.*, **147**: 3915-3920.
- Stadler, J.; Harbrecht, B.G.; DiSilvio, M.; Curran, R.D.; Jordan, M.L.; Simmons, R.L. and T.R. Billiar, Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat kupffer cells, 1993, *J. Clin. Biol.*, **53**: 165-172.
- Stefanovic-Racic, M.; Stadler, J.; Georgescu, H.I. and C.H. Evans, Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes, 1994, *J. Reumatol.*, **21**: 1892-1898.
- Stefanovic-Racic, M.; Meyers, C.; Coffey, J.W.; Hoffman, R.A.; and C.H. Evans, N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats, 1994, *Arthr. & Rheum.*, **37**: 1062-1069.
- Sturn, R.J.; Holloway D.A. and S. Buckley, Potential regulatory role of inflammatory cells on local vascular smooth muscle tone, 1989, *Agents actions*, **27**: 414-417.

- Teixeira, M.M.; Williams, T.J. and P.G. Hellewell, Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin, 1993, *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 1515-1521.
- Thomas, G. and P.W. Ramwell, N^ω-nitro-L-arginine benzyl ester, a potent irreversible inhibitor of endothelium dependent relaxation, 1991, *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **179**: 1977-1682.
- van der Valk, P. and J.R Herman, Leukocyte functions in: Biology of disease, 1987, *Laboratory Investigations*, **57**: 127-137.
- Williams, T.J., Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E₂ as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin, 1982, *Br. J. Pharmacol.*, **77**: 505-509.
- Williams, T.J., Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation, 1979, *Br. J. Pharmacol*, **65**: 517-524.
- Williams, T.J. and M.J. Peck, Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation, 1977, *Nature*, **270**: 530-532.
- Williams, T.J. and J. Morley, Prostaglandins as potentiators of increased permeability in inflammation, 1973, *Nature*, **246**: 215-217.
- Zatz, R., A low-cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats, 1990, *Lab. Anim. Sci.*, **42**: 198-201.
- Yong, T. and W.G. Mayhan, Effect of prostaglandin E₁ on the leukotriene C₄-induced increases in vascular permeability of hamster cheek pouch, 1990, *Inflammation*, **16**: 159-167.

ABSTRACT

The effects of acute and chronic treatment with the nitric oxide (NO) synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and its inactive enantiomer N^ω-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME) on the inflammatory responses (rat paw oedema, vascular permeability and pleurisy) induced by carrageenin in rats have been investigated.

Changes in the rat paw volume were measured with a hydroplethysmometer at 1, 2, 3 and 4 hours after the injection of carrageenin. When necessary, L-NAME or D-NAME was administered subplantarily, intrapleurally or intravenously immediately before the injection of carrageenin.

The subplantar (0.15-1.0 μmol/paw) or intravenous (10-100 μmol/kg) injection of L-NAME dose-dependently inhibited the carrageenin-induced paw oedema. The administration of D-NAME by either route (1 μmol/paw or 100 μmol/kg) had no effect on the foregoing oedema. The inhibition of paw oedema by L-NAME was significantly reversed by the local administration of the prostacyclin analogue iloprost (0.3 μmol/paw). The carrageenin-induced leucocyte migration into the pleural cavity was also dose-dependently inhibited by the intravenous (10-100 μmol/kg) or intrapleural (3-10 μmol/cavity) injection of L-NAME. D-NAME (1 μmol/paw or 350 μmol/kg) had no effect on leucocyte migration. Our results indicate that the inhibition of both paw oedema and cell migration caused by acute L-NAME treatment is subsequent to a reduction in local microvascular blood flow.

Chronic inhibition of NO biosynthesis was achieved by including L-NAME in the drinking water to give an intake of approximately 75 μmol/rat/day for two and four weeks. Control animals received either tap water alone or the inactive enantiomer D-NAME. Since chronic NO inhibition increases blood pressure, we compared the resulting paw oedema with that produced in rats made

hypertensive by occlusion of the left renal artery (2K-1C). In a separate set of experiments, L-NAME-treated animals concomitantly received captopril (140 $\mu\text{mol}/\text{rat}/\text{day}$) to prevent hypertension. Animals chronically treated with L-NAME (but not D-NAME) for two or four weeks developed hypertension to the same extent as 2K-1C rats. Carrageenin-induced paw oedema was significantly reduced in rats chronically treated with L-NAME, but not in those receiving D-NAME or in 2K-1C animals. The subplantar injection of iloprost significantly reversed the inhibition of paw oedema caused by L-NAME. Captopril (140 $\mu\text{mol}/\text{rat}$ day) lowered the high blood pressure levels induced by L-NAME ($p < 0.05$) but did not significantly affect the inhibition of paw oedema by L-NAME. No changes in vascular permeability, as assessed by Evans blue extravasation, were observed in L-NAME-treated animals. The chronic treatment with L-NAME for two or four weeks did not inhibit carrageenin-induced leucocyte migration into the pleural cavity.

It is concluded that although carrageenin-induced paw oedema is reduced in L-NAME-treated rats, this response reflects a decrease in local blood flow rather than an effect on vascular permeability. Furthermore, the chronic inhibition of biosynthesis does not affect vascular permeability and cell migration in the pleurisy model.