

**LETÍCIA REGINA BENETTI**

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) NA  
RESPOSTA ALÉRGICA PULMONAR DE  
CAMUNDONGOS**

**CAMPINAS**

**2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) NA  
RESPOSTA ALÉRGICA PULMONAR DE CAMUNDONGOS**

**LETÍCIA REGINA BENETTI**

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Sob orientação da prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloisa Helena de Araújo Ferreira.

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B435e Benetti, Letícia Regina, 1987 -  
Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) na resposta  
alérgica pulmonar de camundongos / Letícia Regina  
Benetti. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Heloisa Helena de Araújo Ferreira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sulfeto de Hidrogênio. 2. Eosinófilos. 3. Alergia.  
I. Ferreira, Heloisa Helena de Araújo. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on lung allergic response in mice

**Palavras-chave em Inglês:**

Hydrogen Sulfite

Eosinophil

Allergy

**Titulação:** Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Heloisa Helena de Araújo Ferreira [Orientador]

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Angellina Zanesco

**Data da defesa:** 31-01-2012

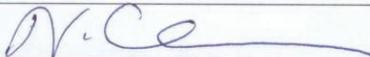
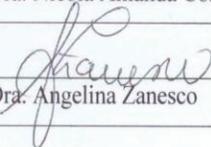
**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

## Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

LETÍCIA REGINA BENETTI

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira

### Membros:


Profa. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Profa. Dra. Angelina Zanesco

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/01/2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Inflamação da Universidade São Francisco/Bragança Paulista, como parte do projeto “Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível nos marcadores de estresse oxidativo e na inflamação alérgica pulmonar em camundongos” financiado pela Fapesp.

## **DEDICATÓRIA**

---

Aos meus pais, pelo amor, apoio e por nunca medirem esforços para que meus sonhos fossem concretizados.

À minha família, por sempre torcer por mim e pela compreensão por nem sempre eu estar presente como gostaria.

## **AGRADECIMENTOS**

Para realizar esta pesquisa, contei com a ajuda e apoio de inúmeras pessoas e instituições. Manifesto minha gratidão:

À Prof<sup>a</sup> Dra. Heloisa Helena de Araujo Ferreira, por confiar no meu potencial desde a Iniciação Científica, pela confiança ao aceitar orientar o desenvolvimento deste projeto e pela orientação durante todos estes anos para que eu desenvolvesse um trabalho com excelência, de maneira ética e profissional;

Aos Doutores Marcelo Nicolás Muscará, Soraia Kátia Pereira Costa e Simone Aparecida Teixeira, pela colaboração no desenvolvimento deste projeto;

À Doutora Denise Gonçalves Priolli, pela colaboração nas análises estatísticas;

À mestranda Cristiane Eloiza Venâncio Guedes pela parceria durante os experimentos, pela análise da atividade da iNOS e pela amizade durante todos esses anos.

À mestranda Daiana Campos pela parceria durante os experimentos e pela amizade desde os tempos da graduação.

Aos amigos que contribuíram na realização dos experimentos: Aline Silva, Kléber Leilsson dos Santos, Jackeline Mendes, Jamille Nogueira e Mariana Fávero de Almeida.

Ao amigo Edmar Henrique Pelaquini, pelos anos de parceria no laboratório e por mesmo afastado, sempre estar à disposição.

Aos técnicos do biotério da Universidade São Francisco: Lázaro e Paulo,  
pelo cuidado com nossos animais;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  
pelo fomento à pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

Anatole France

## SUMÁRIO

---

	PÁG.
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de figuras.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Asma.....	21
1.2 Eosinófilos e asma.....	23
1.3 Radicais livres e asma.....	24
1.4 H <sub>2</sub> S.....	29
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais.....	35
3.2 Divisão dos grupos.....	35
3.3 Sensibilização e desafio antigênico com OVA.....	35
3.4 Tratamento com 1400W.....	36
3.5 Tratamento com NaHS.....	37
3.6 Coleta do lavado broncoalveolar.....	37
3.7 Homogeneização dos pulmões.....	38
3.8 Slot blotting para expressão de nitrotirosina.....	38
3.9 Expressão de iNOS, Mn SOD, Cu/Zn SOD.....	39
3.10 Atividade da NOS.....	41
3.11 Dosagem da concentração de óxido nítrico total (NO <sub>x</sub> ).....	43
3.12 Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Cinética da migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	45
4.2 Padronização da concentração de NaHS.....	48

4.3 Comparação entre o efeito do tratamento com NaHS e 1400W sobre a migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	50
4.4 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre os níveis de óxido nítrico total (NOx) no LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	52
4.5 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W nas atividades das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) no tecido pulmonar de camundongos.....	54
4.6 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na expressão de iNOS nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	56
4.7 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a nitração de tirosina nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	58
4.8 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão de MnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	60
4.9 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão da Cu/ZnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	62
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8. ANEXO.....	85
I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

1400W - N-(3-(aminometil)-benzil) acetamidina

bNOS - óxido nítrico sintase neuronal

BSA - albumina bovina sérica

CBS - cistationina- $\beta$ -sintetase

CSE - cistationina- $\gamma$ -liase

Cu/Zn SOD - cobre/zinco superóxido dismutase

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

ECP - proteína catiônica eosinofílica

EDN - neurotoxina de derivada eosinófilos

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EPO - peroxidase eosinofílica

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>S - sulfeto de hidrogênio

IgE - imunoglobulina E

IL - interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LBA - lavado broncoalveolar

MBP - proteína básica principal

MnSOD - superóxido dismutase

NF- $\kappa$ B - fator nuclear kappa-B

NO<sup>\*</sup> - óxido nítrico

$\text{NO}_2^-$  - nitrito

$\text{NO}_3^-$  - nitrato

NOS - óxido nítrico sintase

$\cdot\text{OH}$  - radical hidroxila

$\text{O}_2^{\cdot-}$  - ânion superóxido

$\text{ONOO}^-$  - peroxinitrito

OVA - ovalbumina

PAG - propargilglicina

RNS - espécies reativas de nitrogênio

ROS - espécies reativas de oxigênio

SOD - superóxido dismutase

## **LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1- Cinética da migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	47
Figura 2- Efeito de diferentes concentrações de NaHS na contagem total e diferencial de leucócitos no LBA de camundongos.....	49
Figura 3- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na migração dos eosinófilos para o LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	51
Figura 4- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na produção de •NO nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA .....	53
Figura 5- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na atividade das enzimas óxido nítrico sintases no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados em 48h após o desafio com OVA.....	55
Figura 6- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na expressão da iNOS nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	57
Figura 7- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a nitração de resíduos de tirosina nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	59
Figura 8- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão da MnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	61

Figura 9- Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão da Cu/ZnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA..... 63

Estudos têm demonstrado que o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) tem um importante papel em vários aspectos da fisiologia e da patologia de diferentes doenças. Este estudo teve como objetivo investigar a ação do H<sub>2</sub>S nos marcadores de estresse oxidativo e sua interação com o óxido nítrico (NO) na inflamação alérgica pulmonar de camundongos. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) e tratados com o doador de H<sub>2</sub>S, hidrosulfeto de sódio (NaHS), ou com o inibidor da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), 1400W, 30 minutos e 2h antes do desafio com OVA, respectivamente. Vinte e quatro, 48 e 96h após o desafio, os animais foram sacrificados e coletou-se o lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial de leucócitos e dosagem dos níveis de NOx; os pulmões foram homogeneizados para análise da expressão das proteínas iNOS, MnSOD e Cu/ZnSOD por Western blotting e verificação dos níveis da 3-nitrotirosina (3-NT) por Slot blotting. A atividade da iNOS foi analisada pela conversão de L-arginina para L-citrulina. Os resultados demonstraram que o tratamento com NaHS inibiu a migração de neutrófilos para os pulmões de camundongos sensibilizados em 24h e 48h e de eosinófilos em 48h após o desafio alérgico, quando comparados com os camundongos controles (não tratados). De maneira semelhante, o tratamento com 1400W inibiu o influxo de eosinófilos para o pulmão dos camundongos alérgicos em 48h. O desafio com OVA provocou aumento da expressão da iNOS nos pulmões dos animais controles em 48h que foi inibida tanto pelo tratamento com NaHS como pelo 1400W. Neste período,

observou-se aumento da atividade da NOS  $\text{Ca}^+$ -independente nos pulmões dos camundongos controles. O tratamento com 1400W, mas não com NaHS, provocou redução desta atividade. Quando comparados com os animais não desafiados, os níveis de NOx nos controles estavam aumentados em todos períodos estudados. Os tratamentos com 1400W e NaHS reduziram seus níveis em 48h e 96h, respectivamente. A expressão da 3-NT foi reduzida pelo 1400W em 48h, mas nenhum efeito foi observado com o NaHS. O desafio com OVA nos animais controles não alterou a expressão de MnSOD, mas provocou aumento da expressão da Cu/ZnSOD em 48h após o desafio com OVA. Neste período, o NaHS reduziu a expressão da MnSOD e o 1400W a expressão da Cu/ZnSOD. Estes resultados demonstram que o efeito anti-inflamatório do  $\text{H}_2\text{S}$  na asma ao inibir a migração de eosinófilos e neutrófilos para os pulmões não é decorrente de mecanismos relacionados à via do  $\text{'NO}$ . Se a redução da expressão da MnSOD verificada nos animais tratados com NaHS está relacionada à apoptose de eosinófilos e/ou neutrófilos e, conseqüentemente, à diminuição do conteúdo destas células no LBA precisa ser verificado.

## **ABSTRACT**

---

Studies have shown that hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) has an important role in various physiological and pathological aspects of different diseases. In this study, we verified the influence of H<sub>2</sub>S on oxidative stress and its interaction the nitric oxide (NO) pathway in the allergic lung inflammation of mice. BALB/c mice were sensitized with ovalbumin (OVA) and treated the H<sub>2</sub>S donor, sodium hydrosulfide (NaHS), or with the inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor, 1400W, 30 minutes and 2h before OVA-challenge, respectively. Twenty-four, 48 and 96h after challenge, mice were sacrificed and the bronchoalveolar lavage (BAL) was collected to investigate the total and differential leukocyte counts and the NOx levels. The lungs were homogenized to analyze the iNOS, MnSOD and Cu/ZnSOD protein expressions by Western blotting and the 3-nitrotyrosine (3-NT) levels by Slot blotting. The iNOS activity was determined by conversion of L-arginine to L-citrulline. Results showed that NaHS-treatment of sensitized mice inhibited neutrophil migration at 24h and 48h, as well as the eosinophil influx to the lungs at 48h after allergen challenge when compared with control mice (untreated). Similarly, 1400W-treatment reduced the content of eosinophils in the BAL of allergic mice at 48 hours. OVA-challenge caused an increase in iNOS expression in the lungs of control mice at 48 hours, which was inhibited by NaHS or 1400W treatments. At this time, an increase in Ca<sup>+</sup>-independent NOS activity was observed in the lungs of control mice. The 1400W-treatment, but not NaHS-treatment, caused a reduction in this activity. When compared with non-challenged

mice, NO<sub>x</sub> levels were increased in controls at all times studied. Treatment with 1400W or NaHS reduced their levels at 48h and 96h, respectively. The 3-NT expression was reduced by 1400W at 48 hours, but no effect was observed with the NaHS-treatment. The OVA-challenge of control mice did not modify the MnSOD expression, but caused increased of Cu/ZnSOD expression at 48 hours. However, the NAHS reduced the MnSOD expression and 1400W inhibited the Cu/ZnSOD expression at this time. These results demonstrated that the anti-inflammatory effect of H<sub>2</sub>S in asthma by inhibiting eosinophils and neutrophil migration to the lungs is not due to mechanisms associated with \*NO pathway. If the reduced MnSOD expression observed in NaHS-treated mice is related with the eosinophil apoptosis and, consequently, decrease of inflammatory cells content in the BAL needs to be studied.

## **1. Introdução:**

### **1.1 Asma**

A asma é uma patologia decorrente da inflamação das vias aéreas, caracterizada pelo acúmulo de muco, edema na mucosa brônquica e aumento da responsividade brônquica. Durante este processo inflamatório ocorre a ativação de mastócitos, macrófagos e linfócitos T nas vias aéreas, além da presença de infiltrado eosinofílico, que desempenha um papel fundamental na patogênese da asma (revisado por Kroegel et.al., 1994). Os sintomas da asma são mediados por uma ampla gama de compostos como a histamina, citocinas, ciclo-oxigenases e produtos de lipoxigenases liberado pelas células inflamatórias, principalmente, o mastócito e o eosinófilo (revisado por Holgate, 2008).

Atualmente, estima-se que 300 milhões de pessoas no mundo sofram com a asma, chegando a atingir proporções de epidemia (Saunders et al, 2010). Tal patologia pode ser classificada como asma ocupacional, atópica (alérgica) e não atópica, sendo predominante a forma atópica (revisado por Hamid & Tulic, 2009).

Embora existam várias formas de asma, o foco das pesquisas nos últimos 25 anos tem sido a asma atópica, que acomete indivíduos que têm a predisposição genética para produzir imunoglobulina E (IgE) contra antígenos (alérgenos) que não induzem síntese de IgE na maioria da população. (revisado por Kim et al., 2010).

As principais causas da asma estão associadas à alérgenos presentes na poluição do ar, poeira doméstica, ácaros, mofo e pelos de animais, etc.

Alguns fatores ambientais como mudanças de temperatura, estresse e exercício físico estão relacionados ao desencadeamento ou exacerbação da hiperreatividade brônquica (revisto por Holgate, 2008).

Após a inalação, os alérgenos entram em contato com a mucosa pulmonar e são capturados pelas células dendríticas presentes no epitélio brônquico. Tais células são capazes de reconhecer e processar o antígeno, apresentando seus fragmentos peptídicos ligados à molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC II) aos linfócitos T auxiliares (Th; revisto por Holgate, 2008).

Indivíduos asmáticos possuem linfócitos T ativados, com um perfil Th<sub>2</sub> que sintetizam e liberam citocinas que atraem granulócitos, principalmente eosinófilos, para a superfície da mucosa. A interleucina-5 (IL-5) e o fator estimulante de colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) induzem os eosinófilos a produzirem cisteinil-leucotrienos e a liberar proteínas dos grânulos que lesam o epitélio (revisto por Holgate, 2008).

Os linfócitos Th<sub>2</sub> produzem IL-4 e IL-13 que induzem as células B a secretarem IgE. Os anticorpos IgE ligam-se ao receptor de alta afinidade para a IgE, o FcεRI, presente em mastócitos e basófilos e no FcεRII, presente nos eosinófilos, sensibilizando estas células ao alérgeno exposto. A subsequente ligação dos alérgenos ao complexo IgE-FcεR desencadeia a desgranulação de vesículas citoplasmáticas contendo histamina e a formação e liberação de prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>), leucotrienos (LTC<sub>4</sub>) e citocinas, resultando na contração do músculo liso, secreção mucosa e vasodilatação (revisto por Hamid e Tulic, 2009).

As citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, produzidas pelos linfócitos Th<sub>2</sub>, induzem alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar que estão associados com a asma, como o infiltrado de eosinófilos, linfócitos e mastócitos pulmonar, além da ativação de macrófagos, proliferação de células epiteliais, hiperplasia de células caliciformes com aumento de secreção de muco, hiperplasia de músculo liso, hipertrofia e hiper-contratilidade. Juntas, essas mudanças na estrutura das vias aéreas causam dificuldade de respirar, sibilância e tosse causadas pela obstrução reversível das vias aéreas que é amenizada pela inalação de  $\beta$ -adrenérgicos (revisto por Finkelman et al., 2010).

## **1.2 Eosinófilos e a asma**

Os eosinófilos são polimorfonucleares produzidos na medula óssea a partir de células progenitoras CD34<sup>+</sup>, e se diferenciam sob a ação das IL-3 e IL-5 e do GM-CSF (Lampinen et al, 2004).

Após o período de diferenciação, os eosinófilos apresentam um núcleo bilobado, com cromatina altamente condensada, e dois tipos principais de grânulos: específico e primário. Os grânulos específicos possuem uma aparência estrutural diferente, com um núcleo elétron-denso e contendo proteínas catiônicas que dão uma coloração única aos eosinófilos. As principais proteínas catiônicas nos grânulos específicos são: proteína básica principal (MBP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina de derivada eosinófilos (EDN). Os grânulos primários são semelhantes aos encontrados em outros tipos de granulócitos, formados no início do desenvolvimento dos eosinófilos e com cristais de Charcot-Leyden.

Eles também contêm corpos lipídicos, sendo este o principal local de síntese de eicosanóides (Kroegel et al., 1994)

Estudos de literatura utilizando modelos experimentais que mimetizam o quadro de asma mostram uma grande infiltração de eosinófilos nos pulmões de animais sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA; Feder et al., 1997; Haile et al., 1999; Iijima et al., 2001; Koarai et al., 2002; Ferreira et al., 1998 e 2004 e 2011)

Os eosinófilos estão presentes nas vias aéreas, no escarro e no lavado broncoalveolar de pacientes com asma. Tais células liberam nos tecidos proteínas de grânulos, como a MBP, a EPO, a ECP e a EDN, além de ter a capacidade de geração de eicosanóides, como a prostaciclina ( $PGI_2$ ) e leucotrieno ( $LTD_4$ ). Liberam também no tecido pulmonar o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), potencialmente prejudicial, além de fatores de crescimento que atuam no remodelamento das vias aéreas (revisito por Holgate, 2008 e Ichinose, 2009).

### **1.3 Radicais Livres e asma**

Os radicais livres são moléculas que possuem em sua órbita mais externa um ou mais elétrons não pareados, conferindo assim uma maior reatividade a esta molécula. Eles podem ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas e o seu alvo celular está relacionado ao seu sítio de formação (Salahudeen, A.K., 1999).

Em condições fisiológicas, os metabólitos tóxicos do oxigênio são gerados em níveis muito baixos nas células do pulmão pela transferência de um elétron durante o metabolismo aeróbio, resultando em espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem os radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Do mesmo modo, espécies reativas de nitrogênio (RNS) como o <sup>•</sup>NO, nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) são fisiologicamente necessárias e potencialmente destrutivas, desempenhando tanto um papel fundamental para a modulação de funções fisiológicas, como sinalização intra e intercelular e morte de microorganismos por fagócitos, quanto um papel destrutivo se produzido em quantidades excessivas (revisto por Comhair e Erzurum, 2002).

Pesquisas têm demonstrado que interações entre células e mediadores endógenos (peroxissomos, NADPH oxidase, xantina oxidase, mitocôndria e citocromo P-450) ou exógenos (radiação-γ, cigarro e solventes orgânicos) podem resultar em elevados níveis de ROS, como O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, <sup>•</sup>OH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e RNS, como o óxido nítrico (<sup>•</sup>NO), que juntos com a perda das defesas antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD), participam da patogênese da asma (revisto por Comhair e Erzurum, 2010).

O aumento de ROS e RNS leva a modificações de proteínas e alterações nas suas funções que são biologicamente relevantes para o início e manutenção do processo inflamatório, entre as quais está a perda da capacidade oxidante da SOD, que catalisa a reação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e da catalase que catalisa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a água (revisto por Comhair e Erzurum, 2010).

Desde 1987, quando o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) foi identificado como <sup>•</sup>NO, inúmeros relatos têm indicado que esta pequena molécula gasosa é um mediador presente em muitos e diferentes processos biológicos, tais como vasodilatação, neurotransmissão, citotoxicidade, relaxamento de músculos lisos e broncodilatação (revisto por Villanueva e Giulivi, 2010).

O  $\text{NO}$  tem propriedades químicas distintas em grande parte como resultado do elétron desemparelhado que possui, sendo uma molécula altamente reativa (revisado por Ricciardolo et al., 2006). É sintetizado a partir da L-arginina, pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS; Palmer et al., 1988). Tais enzimas são divididas em três famílias: NOS endotelial (eNOS) e neural (nNOS), que são constitutivas e cálcio-ativadas, e a NOS induzível (iNOS), que é cálcio-independente (Moncada et al., 1991).

Dentre estas três isoformas, estudos demonstram que no tecido pulmonar a iNOS é a isoforma de maior interesse por ser altamente induzível por uma variedade de citocinas inflamatórias, produzindo grandes quantidades de  $\text{NO}$  e aumentando os níveis de  $\text{NO}$  exalado na asma. (revisado por Rodway et al., 2009).

O aparecimento de doenças inflamatórias das vias respiratórias é associado ao aumento da produção de  $\text{NO}$ . Em modelos animais, a inflamação e a hiperresponsividade das vias aéreas induzidas por alérgeno são amplamente modificadas por inibidores da síntese de  $\text{NO}$ . Além disso, a hiperprodução de  $\text{NO}$  mediada pela enzima iNOS tem sido demonstrada nas vias aéreas de modelos animais experimentais de asma. O tratamento com esteróides reduz a geração de  $\text{NO}$ , sugerindo que este pode ser parcialmente responsável pela inflamação das vias aéreas de asmáticos (revisado por Ichinose, 2009).

O envolvimento da iNOS na resposta alérgica pulmonar foi demonstrado por Iijima et al. (2001) que verificou em modelos de ratos A/J alérgicos que o tratamento com 1400W, um inibidor seletivo da iNOS, provocou uma redução da migração de eosinófilos para os pulmões dos animais. Esse mesmo

resultado foi obtido em nosso laboratório por Pelaquini et al. (2011) utilizando modelo de camundongos BALB/c alérgicos.

Estudos mostraram que altas concentrações de  $\cdot\text{NO}$  produzem efeitos citotóxicos em células epiteliais respiratórias (Heiss et al., 1994). As propriedades citotóxicas do  $\cdot\text{NO}$  têm sido atribuídas à formação de  $\text{ONOO}^-$ , um intermediário altamente reativo gerado por uma reação entre  $\cdot\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (revisto por Beckman et al., 1996). Foi mostrado que o  $\text{ONOO}^-$  pode causar descamação epitelial e induzir a hiperresponsividade das vias aéreas em modelo animal, sugerindo que o  $\cdot\text{NO}$  tem potencial para mediar lesões celulares e inflamação, com efeitos imunomoduladores que predisõem à hiperresponsividade brônquica (revisto por Puckett et al., 2008).

Células inflamatórias recrutadas para as vias aéreas de pacientes asmáticos têm uma excepcional capacidade de produzir ROS. A ativação de eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos geram  $\text{O}_2^{\cdot-}$  através do complexo NADPH oxidase de membrana. A dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produz  $\text{H}_2\text{O}_2$  e ambos, apesar de serem oxidantes moderados, são importantes para a formação de radicais citotóxicos potentes por suas interações com outras moléculas. O radical  $\cdot\text{OH}$ , um poderoso oxidante, pode ser produzido a partir do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e ácido hipocloroso ou ácido hipobromoso ( $\text{HOCl}$  ou  $\text{HOBr}$ ), que são formados a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e um haleto de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) ou bromo ( $\text{Br}^-$ ). Esta reação pode ser catalizada pela MPO do neutrófilo e monócito ou através da EPO do eosinófilo, que prefere o  $\text{Br}^-$ . O dano oxidativo causado pelos eosinófilos pode ser substancial porque estas células possuem maior capacidade de produzir  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  do que os neutrófilos e o conteúdo de EPO nos eosinófilos é 2-4

vezes maior que a quantidade de MPO no neutrófilo (revisto por Dworski, 2000).

A mais importante interação entre o  $\cdot\text{NO}$  e o  $\text{O}_2\cdot^-$  é sua rápida reação para formar o potente oxidante  $\text{ONOO}^-$  que induz a formação de resíduos de nitrotirosina. Além do  $\text{ONOO}^-$ , muitas outras RNS podem ser geradas a partir da interação do  $\cdot\text{NO}$  com o  $\text{O}_2\cdot^-$ . O  $\text{NO}_2^-$ , derivado do  $\cdot\text{NO}$ , em associação com o HOCl, pode ser utilizado pela MPO ou EPO para formar o  $\text{NO}_2\text{Cl}$  (cloreto nitroso) e  $\text{NO}_2$  (dióxido de nitrogênio), além de produzir a nitração da tirosina. Portanto, altas concentrações de  $\cdot\text{NO}$  formado pela iNOS,  $\text{ONOO}^-$  e nitração da tirosina podem causar uma variedade de efeitos patofisiológicos que caracterizam a asma (revisto por Ricciardolo, 2004).

Em geral, o pulmão humano possui um sistema antioxidante que atua de forma integrada e eficaz no combate às ROS e RNS. No entanto, a capacidade antioxidante do trato respiratório é prejudicada na asma (Comhair et al., 2005). Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), atuam como importante componente do sistema antioxidante de defesa contra radicais livres. A SOD é composta de três isoformas: a cobre/zinco superóxido dismutase (Cu/Zn SOD), a manganês superóxido dismutase (MnSOD) e a SOD extracelular (EC-SOD) (Abe et al., 2006).

No meio intracelular a Cu/ZnSOD está presente em todo o citoplasma e núcleo. A MnSOD é a isoforma mitocondrial sintetizada no citoplasma e translocada para o interior da matriz mitocondrial e a EC-SOD está presente no meio extracelular (Wei et al., 2008).

A atividade da SOD é menor nos pulmões asmáticos, em comparação com controles saudáveis, e diminui ainda mais durante um ataque asmático.

Porém a expressão da MnSOD não é diferente em controles saudáveis comparados com asmáticos e a expressão da Cu/ZnSOD é maior em pulmões asmáticos quando comparado a controles saudáveis. A inibição da atividade da SOD em células malignas leva a danos mediados pelos radicais livres à membrana mitocondrial, liberação de citocromo C e apoptose. Com isso, é sugerida a hipótese de que a perda de células epiteliais das vias aéreas na asma é causada pela apoptose, desencadeada pela modificação e inativação da SOD, que está especificamente relacionada com o ambiente inflamatório das vias aéreas asmáticas (Comhair et al., 2005).

Estudos demonstraram que em modelo animal de asma alérgica, na presença de estresse oxidativo, ocorre a ativação de um número de elementos inflamatórios sensíveis a oxidantes, incluindo fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e citocinas como TNF- $\alpha$  e expressão de genes para iNOS (Blesa et al., 2003). Confirmando estes conhecimentos, o tratamento com um antioxidante, a n-acetilcisteína, atenuou a ativação desses fatores, bem como promoveu um efeito benéfico sobre as características típicas da asma, tais como hiperresponsividade das vias aéreas, eosinofilia e exsudação (Blesa et al., 2003).

#### **1.4 H<sub>2</sub>S**

O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um gás incolor com um forte odor de ovo podre. O nível detectável deste gás pelo nariz humano está em uma concentração 400 vezes menor que seu nível tóxico. A oxidação do H<sub>2</sub>S produz enxofre elementar (S), dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e sulfatos, tais como ácido

sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). O  $\text{H}_2\text{S}$  pode ser hidrolisado para hidrosulfetos, como o hidrosulfeto de sódio ( $\text{NaHS}$ ) e íons sulfeto ( $\text{S}_2^-$ ). Mesmo em uma solução aquosa de pH 7,4, cerca de um terço do  $\text{H}_2\text{S}$  permanece não dissociado. A membrana plasmática é permeável ao  $\text{H}_2\text{S}$  e sua solubilidade em solventes lipofílicos é aproximadamente cinco vezes maior do que na água (revisto por Wang, 2002).

O  $\text{H}_2\text{S}$  é considerado como contaminante ambiental proveniente dos campos de petróleo e gás natural, das águas subterrâneas, das zonas pantanosas, das jazidas de sal, de carvão, de minérios sulfetados e da emissão de vulcões (Moulin et al., 2002). Atualmente, está claro que o  $\text{H}_2\text{S}$  também é sintetizado naturalmente a partir da L-cisteína em muitos tecidos de mamíferos e não mamíferos, em uma reação catalisada por duas enzimas principais, a cistationina- $\gamma$ -liase (CSE) e cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS), esse gás pode ter papéis potencialmente importantes em vários aspectos fisiológicos e patológicos. Recentemente, diferentes estudos têm verificado o papel do  $\text{H}_2\text{S}$  na inflamação, no sistema cardiovascular, no diabetes mellitus e mediando respostas em neurônios através de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (revisto por Lowicka e Beltowski, 2007).

O  $\text{H}_2\text{S}$  é uma molécula altamente reativa podendo reagir com outros compostos, especialmente com os ROS e RNS. Quando reage com o  $\cdot\text{NO}$ , forma compostos nitrosotióis inativos, cuja estrutura química ainda não foi definida (Whiteman et al 2006). No entanto, já foi demonstrado que o  $\text{H}_2\text{S}$  reage com quatro diferentes ROS, ou seja, com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o  $\text{ONOO}^-$  e o  $\text{ClO}^-$ , limitando os efeitos tóxicos destes radicais. Por isso, o  $\text{H}_2\text{S}$  tem sido

considerado um importante agente antioxidante no organismo (revisto por Lowicka e Beltowsky, 2007).

Existem numerosas analogias entre o H<sub>2</sub>S e o •NO; ambos são gases que permeiam as células sob condições fisiológicas, se difundindo livremente através das membranas celulares sem a necessidade de utilizar receptores de membrana, além de serem sintetizados a partir de simples aminoácidos, ou seja, cisteína e arginina, respectivamente. (revisto por Calvert et al., 2010). Além disso, ambos os gases ocorrem naturalmente no sangue e exercem atividade vasodilatadora *in vitro* e *in vivo* ainda que por diferentes mecanismos, ou seja, para o H<sub>2</sub>S via abertura de canais K-ATP sensíveis do músculo liso (Zhao et al., 2001) e para o •NO via ativação da guanilato ciclase solúvel (Arnold et al., 1977). O •NO também induz o relaxamento da musculatura vascular subjacente através da ativação de canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependente (Zhao et al., 1997).

Recentemente, surgiu o interesse em estudar o papel do H<sub>2</sub>S na inflamação. Alguns estudos como os de Bhatia et al (2005) indicam uma ação pró-inflamatória deste gás. Neste estudo, utilizando um modelo animal de pancreatite induzida por ceruleína, verificou-se que o nível plasmático de H<sub>2</sub>S e a expressão da CSE tecidual estavam aumentados, mas uma redução da inflamação foi observada pela inibição da síntese de H<sub>2</sub>S pelo tratamento com DL-propargilglicina (PAG). Utilizando modelo animal de choque endotóxico induzido por LPS, Li et al (2005) verificaram um aumento dos níveis plasmáticos de H<sub>2</sub>S, associado com o aumento da regulação da CSE. Esse mesmo estudo também verificou que a administração de um doador de H<sub>2</sub>S, o hidrossulfeto de sódio (NaHS), provocou danos teciduais nos pulmões dos

animais, aumento da atividade da MPO pulmonar e aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ .

Por outro lado, alguns estudos indicam que o H<sub>2</sub>S endógeno possui ação antiinflamatória. Zanardo et al (2006) demonstrou que o uso de doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS ou sulfeto de sódio, o Na<sub>2</sub>S) inibe a adesão leucocitária nas vênulas mesentéricas induzida pela aspirina e reduz o edema de pata induzido por carragenina. Fiorucci et al (2007) verificou em um modelo animal de colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) que a administração de um doador de H<sub>2</sub>S, a ATB-429, reduziu os sintomas causados por esta patologia, como diarreia, perda de peso e sangue nas fezes, reduzindo também a atividade da MPO e a lesão tecidual do cólon.

Chen et al (2005) observaram que os níveis de H<sub>2</sub>S nas vias aéreas estavam aumentados em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) estáveis e diminuídos em pacientes com a DPOC exacerbada, corroborando para o conceito de seu papel como agente protetor nas inflamações pulmonares não alérgicas.

Li et al (2008) verificaram que em modelo animal de injúria pulmonar aguda induzida por ácido oléico, o tratamento com NaHS diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-8) e aumentou os níveis de citocinas antiinflamatórias (IL-10), sugerindo que o H<sub>2</sub>S possui um importante papel na resposta inflamatória aguda. Resultados semelhantes foram obtidos por Esehie et al (2008), que verificaram em modelo animal de lesão pulmonar induzida por inalação de fumaça que o tratamento com H<sub>2</sub>S aumentou a sobrevivência dos animais, diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  e aumentou os níveis de

citocinas antiinflamatórias (IL-10), demonstrando assim seu efeito protetor na lesão pulmonar.

Chen et al. (2009) observaram que os níveis séricos e pulmonares de H<sub>2</sub>S em ratos asmáticos estavam negativamente relacionados com o infiltrado de eosinófilos e neutrófilos no lavado broncoalveolar e com a deposição de colágeno nos pulmões. Neste mesmo trabalho, o tratamento dos animais com o doador de H<sub>2</sub>S, o NaHS, teve um efeito inibidor na inflamação e remodelamento das vias aéreas, que foi correlacionado com uma diminuição da atividade da iNOS. No entanto, efeito contrário em relação à iNOS foi verificado em outro sistema, quando o H<sub>2</sub>S aumentou a produção de \*NO estimulada por IL-1 $\beta$  via aumento de expressão da iNOS e do NF- $\kappa$ B em células do músculo liso vascular (Jeong et al., 2006).

## **2. Objetivo**

Este estudo teve como objetivo investigar a ação do H<sub>2</sub>S nos marcadores de estresse oxidativo e sua interação com o <sup>•</sup>NO na inflamação alérgica pulmonar de camundongos.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/C fêmeas, com 6 a 8 semanas, adquiridos no Centro multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade São Francisco com ciclos de claro-escuro de 12 horas, umidade e temperatura controlada e com ração e água à vontade.

Os protocolos experimentais deste projeto de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade São Francisco, sob nº nº 0021108.

#### **3.2 Divisão dos grupos**

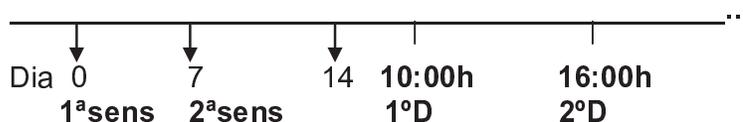
Os animais foram divididos em grupos da seguinte forma:

- 1) Animais não desafiados: sensibilizados com Ovalbumina Grau V (OVA) e falsamente desafiados com cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril.
- 2) Animais controle: sensibilizados e desafiados com OVA.
- 3) Animais tratados com 1400W: sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com 1400W.
- 4) Animais tratados com NaHS: sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com NaHS.

#### **3.3 Sensibilização e desafio antigênico com OVA**

Nos dias 0 e 7 os camundongos foram sensibilizados com 400 µl de uma solução contendo 100 µg de OVA adsorvida em 4 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>), aplicada no dorso do animal, via subcutânea. No dia 14 os

animais sensibilizados foram desafiados por administração intranasal de 10 µg de OVA em 50 µl NaCl 0,9% estéril, às 10:00h e às 16:00h, conforme mostrado no esquema 1.

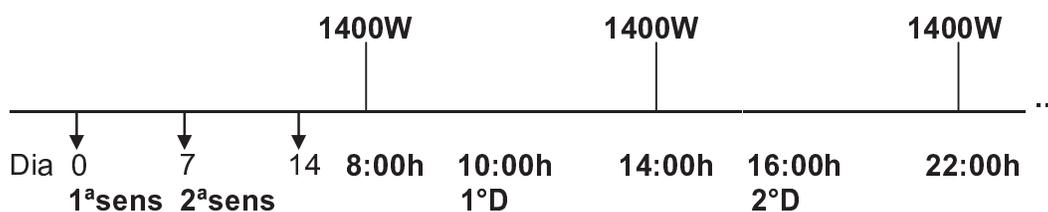


**Esquema 1.** Protocolo de sensibilização e desafio dos animais  
Sens. = sensibilização, D = desafio e h = horas

### 3.4 Tratamento com 1400W

O tratamento dos camundongos com 1400W foi realizado conforme descrito por Iijima et al. (2001), onde os animais receberam injeção intraperitoneal de uma solução de 1400W na concentração de 1 mg/Kg dissolvidos em 300 µl de NaCl 0,9% estéril.

O tratamento com 1400W foi administrado 3 vezes ao dia: 2 horas antes de cada desafio e 6 horas após o último desafio conforme demonstra o esquema 2.

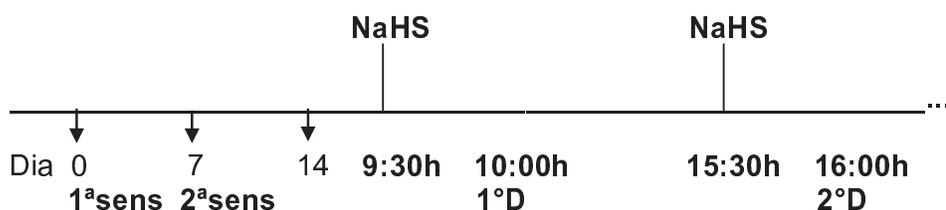


**Esquema 2.** Protocolo de tratamento dos animais com 1400W

Sens. = sensibilização, D= desafio e h = horas

### 3.5 Tratamento com NaHS

O tratamento dos camundongos com o NaHS foi realizado baseado em Li et al. (2008). Os animais receberam, via intraperitoneal, 400 µl de uma solução de NaHS 14 µmol/Kg dissolvidos em solução de Tyrode (200 mg de NaCl, 5 mg de KCl, 1,25 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mg de Glicose, 25 mg de NaHCO<sub>3</sub>), 2 vezes ao dia, 30 minutos antes de cada desafio como mostra o esquema 3.



**Esquema 3.** Protocolo de tratamento dos animais com NaHS.

Sens. = sensibilização, D= desafio e h = horas

### 3.6 Coleta do lavado broncoalveolar

Após os animais serem sacrificados por overdose de isoflurano em 24h, 48h e 96h após o primeiro desafio, a traquéia foi exposta e canulada com catéter intavascular 20G. A cavidade torácica foi, então, aberta para visualização dos pulmões e posicionamento do catéter.

Para coletar o lavado broncoalveolar (LBA), foi injetado e aspirado 0,5 ml de NaCl 0,9% estéril através do catéter, sendo este procedimento repetido por 3 vezes. O LBA foi centrifugado a 100 g por 10 minutos a 20°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, alíquotado e armazenado em freezer -80°C. As células precipitadas foram ressuspensas em volume adequado de salina tamponada fosfatada contendo 2 mM de ácido

etilenodiaminatetracético (PBS/EDTA 2 mM) para contagem total. A concentração das células foi acertada para  $2 \times 10^6$  cél/ml com PBS/EDTA 2 mM e foram confeccionadas lâminas que, posteriormente, foram coradas com Diff-Quick para contagem diferencial de eosinófilos, neutrófilos e mononucleares, utilizando microscópio óptico.

### **3.7 Homogeneização dos pulmões**

Após o sacrifício dos animais, o lobo inferior do pulmão esquerdo foi retirado e homogeneizado em 300 µl de tampão tris (hidroximetil) aminometano 50 mM (Tris 50 mM), pH 7,4 contendo coquetel inibidor de protease 1% [*Dimethyl sulfoxide, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Aprotinin from bovine lung, Bestatin hydrochloride, N-(trans-epoxysuccinyl-L-leucine 4-quinidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate, Pepstatin A*] e fenilmetilsulfonilflúor 0,5 M (PMSF 0,5 M).

Após este procedimento, o homogenato pulmonar foi centrifugado a 800 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi alíquotado, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80°C.

### **3.8 Slot blotting para expressão de nitrotirosina**

A dosagem de proteínas das amostras de homogenato pulmonar foi realizada pelo método descrito por Bradford et al., 1976.

As amostras foram diluídas em tampão Tris 50 mM pH 7,4 com PMSF 0,5 M e 5 µg de proteínas foram pipetadas na câmara de Slot blotting preparada com a membrana de nitrocelulose.

Após afixação das proteínas, a membrana foi lavada com tampão salina Tris suplementado com Tween 20 (20 mM de tris pH 7,6, 0,137 M de NaCl e 0,2% de Tween 20)(TBST) e corada com Ponceau. A membrana foi, então, lavada com TBST até a descoloração e foi realizado o bloqueio da membrana com caseína 0,2% por 1 hora. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada e incubada por uma noite com anticorpo primário anti-nitrotirosina (Upstate Biotechnology, NY, USA) na diluição de 1:2000. Seguiu-se incubação com o anticorpo secundário IgG conjugado com a peroxidase (Upstate Biotechnology, NY, USA) na diluição de 1:3000 por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST e incubada com reagente de quimiluminescência (Thermo SCIENTIFIC– SuperSignal West Pico Chemiluminescent, IL, USA). As imagens de quimiluminescência foram visualizadas e digitalizadas usando o sistema de Chemilmager 5500 (Alpha Scientific), e as intensidades de bandas foram determinados por densitometria utilizando o software do equipamento.

### **3.9 Expressão de iNOS, Mn SOD, Cu/Zn SOD**

A expressão das enzimas iNOS, MnSOD e Cu/ZnSOD nos homogenatos do lobo inferior esquerdo do pulmão foram verificadas utilizando-se técnica de Western blotting. Após as dosagens das proteínas dos homogenatos pelo método descrito por Bradford et al (1976), 25 µg de proteínas foram aplicados no gel SDS-PAGE para a realização da eletroforese usando o sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad laboratories, CA, USA).

Após a eletroforese, as proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad laboratories – Trans-Blot Transfer

Medium, CA, USA) usando-se o sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad laboratories, CA, USA). A membrana foi, então, corada com Ponceau para confirmar a transferência das proteínas.

Para realizar o bloqueio e a incubação com os anticorpos utilizamos o sistema de detecção de proteínas (SNAP- Millipore, MA, USA). Após o bloqueio do sítios não específicos com solução de Albumina de soro bovino 1% (BSA 1%), a membrana foi incubada com o anticorpo primário. Para detectar a ligação dos anticorpos, a membrana foi lavada com TBST e incubada com o anticorpo secundário IgG conjugada com a peroxidase (Upstate Biotechnology, NY, USA) na diluição de 1,66 µg/ml em tampão TBST. A ligação dos anticorpos específicos foi visualizada pela exposição a filme fotográfico (Kodak – Medica X-ray Film, N.Y, USA) após o tratamento da membrana com o sistema de quimioluminescência (Thermo SCIENTIFIC– SuperSignal West Pico Chemiluminescent, IL, USA). As bandas foram escaneadas (HP Scanjet G2710, HP) e a densitometria foi calculada utilizando o software UN-SCAN-IT gel (Silk Scientific, Inc. – UM-SCAN-IT, Utah, USA).

Para a detecção da iNOS não foi utilizado o equipamento SNAP, ou seja, após o bloqueio da membrana com BSA 1% por 1 hora e meia, a membrana foi lavada com TBST por 1 hora e incubada a 8°C com o anticorpo primário anti-iNOS durante toda a noite. Na manhã seguinte a membrana foi lavada durante 1 hora com TBST e incubada por 1 hora e meia com o anticorpo secundário IgG conjugada com a peroxidase (Upstate Biotechnology, NY, USA) na concentração de 1:4000. Após esse período, a membrana foi lavada com TBST por 1 hora e a ligação do anticorpo específico foi visualizada como descrito anteriormente.

Como controles dos ensaios para a MnSOD e Cu/ZnSOD foram aplicadas no gel 25 µg de homogenato de fígado e cérebro, respectivamente, ambos produzidos em nosso laboratório. Para controle da iNOS foi utilizado 5 µg de lisado de macrófagos de camundongo estimulados com IFN $\gamma$ /LPS (BD Biosciences, MD, USA).e do controle da iNOS.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-MnSOD (Upstate Biotechnology, NY, USA) na concentração de 1,49 µg/ml; anti-CuZnSOD (Upstate Biotechnology, NY, USA) na concentração de 1 µg/ml; anti-iNOS (Upstate Biotechnology, NY, USA) na concentração de 2,5 µg/ml e anti- $\beta$ -actina (Upstate Biotechnology, NY, USA) na concentração de 1,49 µg/ml. Todos foram diluídos em TBST.

### **3.10 Atividade da NOS**

O método utilizado para verificar as atividades das NOS dependente e independente de Ca<sup>++</sup> foi o descrito por Förstermann et al. (1990) e está baseado na conversão da [<sup>3</sup>H]L-arginina para [<sup>3</sup>H]L-citrulina. As amostras do tecido pulmonar foram homogeneizadas em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF (inibidor de proteases, Sigma) e 1 mM de L-citrulina. Um volume de 50 µl de cada homogenato foi incubado à temperatura ambiente (25 - 27°C) durante 15 minutos na presença de 1 mM de NADPH, 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e 10 µM de L-arginina contendo 100.000 dpm de [2,3,4,5-<sup>3</sup>H]L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100 µl. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (com exceção do PMSF e da L-citrulina). Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5,4,

contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, durante cinco minutos e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em tubos de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados aos anteriores. Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação, a radioatividade foi medida durante 1 minuto em espectrômetro de cintilação (Beckman – EUA).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistiram na omissão do  $\text{CaCl}_2$  e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS quanto à dependência da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de incubação), ou na adição de 1 mM de L-NAME (inibição específica para as NOS). As contagens foram corrigidas por subtração do “branco” (em que o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES) e da contagem obtida pelos tubos que contém L-NAME correspondente de cada amostra. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à contagem total, e os conteúdos destes tubos receberam  $[2,3,4,5\text{-}^3\text{H}]\text{L-arginina}$  mono hidrocloreto diretamente nos vials de cintilação, pela fórmula descrita a seguir, em que 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 15 é o tempo de incubação (em minutos):

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times ((\text{cpm}_{\text{amostra}} - \text{cpm}_{\text{branco}}) - \text{cpm}_{\text{L-NAME}}) / \text{cpm totais} / 15$$

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado pelo método de Bradford (1976) e a atividade da NOS foi expressa em pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína. A atividade da NOS  $\text{Ca}^{+2}$  -

dependente foi obtida pela subtração da atividade da  $\text{Ca}^{+2}$ -independente, que possuía EGTA no meio de incubação da atividade total.

### **3.11 Dosagem da concentração de óxido nítrico total (NOx)**

A concentração de óxido nítrico total (nitrito mais nitrato) foi determinada pelo método de Griess de acordo com Grisham et al., 1996. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, onde foram adicionados, em duplicatas, 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de LBA, 20  $\mu\text{l}$  de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) 100 $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{l}$  de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{l}$  de nitrato redutase ( $\text{NO}_3^-$  redutase) 100 U/ml e incubado a 37°C por 1 hora para a conversão do nitrato em nitrito. Após este período foi adicionado em cada poço 20  $\mu\text{l}$  de lactato desidrogenase (LDH) 13,5 U/ml, 20  $\mu\text{l}$  de ácido pirúvico (Pyr) 9mM e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50  $\mu\text{l}$  de reagente de Griess (Sigma, MO,USA) e a placa foi novamente incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura da reação colorimétrica foi realizada com absorvância de 540 nm em leitor Versamax (Molecular Devices, CA, USA). A concentração de nitrito foi determinada utilizando uma curva padrão de 0,2 a 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$ .

### **3.12 Análise estatística**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de n animais. Os resultados da migração de células para os pulmões, a NOx e as atividades das NOS foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

As medianas (intervalo interquartil e valores mínimos e máximos) obtidas dos resultados dos Westerns blottings foram analisados por estatística não paramétrica usando o Kurskal-Wallis seguido pelo teste pelo Mann-Whitney para múltiplas comparações. Foram considerados significativos os valores de  $p$  menores que 0,05.

## **4. Resultados**

### **4.1 Cinética da migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

O infiltrado de células totais no LBA dos animais sensibilizados e não desafiados (grupo ND) era compreendido predominantemente de células mononucleares, não sendo detectada a presença de neutrófilos ou eosinófilos em nenhum dos horários estudados (figuras 1).

Sabe-se que durante o processo inflamatório alérgico das vias aéreas ocorre a migração de diversos tipos celulares para os pulmões. Para determinar os tipos e o número de células presentes nos pulmões de animais sensibilizados e desafiados com OVA, realizamos a análise dos leucócitos presentes no LBA em 24h, 48h e 96h após o desafio com OVA.

Conforme mostra a figura 1, a análise das células presentes no LBA dos animais sensibilizados e desafiados com OVA (grupo controle) mostrou um aumento crescente do número de leucócitos totais; este aumento foi significativo em 48h e 96h após o desafio quando comparado ao grupo não desafiado.

Do mesmo modo, o número de eosinófilos no LBA dos camundongos controles segue uma cinética crescente de aumento a partir de 24h, sendo os maiores níveis observados em 96h após o desafio com OVA (figura 1).

Nenhuma diferença foi observada no infiltrado de células mononucleares em nenhum dos períodos estudados. O número destas células no LBA não mostrou diferenças entre os camundongos controle e ND (figura 1).

A migração de neutrófilos para o pulmão dos camundongos controles seguiu uma cinética decrescente, sendo que em 24h observou-se aumento significativo quando comparada ao grupo ND (figura 1).

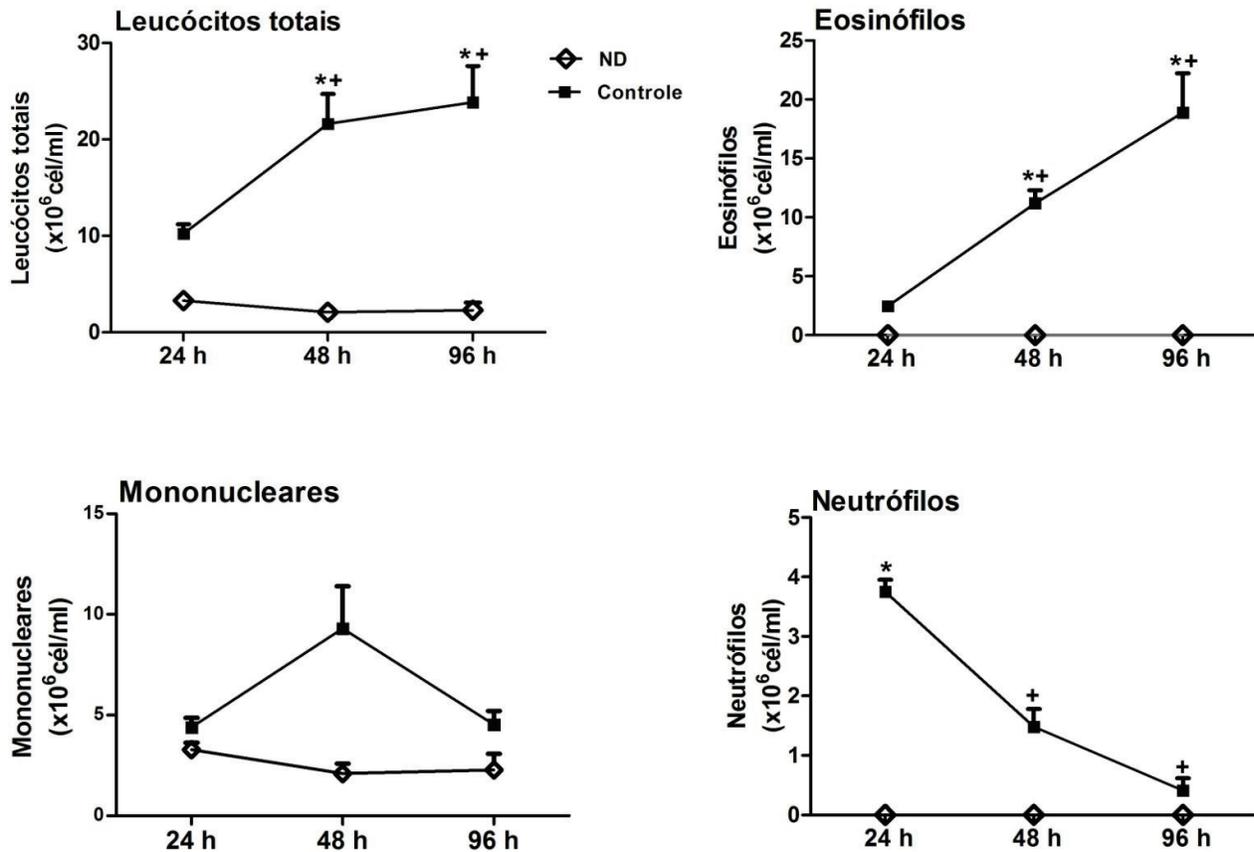


Figura 1. Cinética da migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o desafio com OVA (Controle). Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 8 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo ND. + $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle em 24h.

## 4.2 Padronização da concentração de NaHS

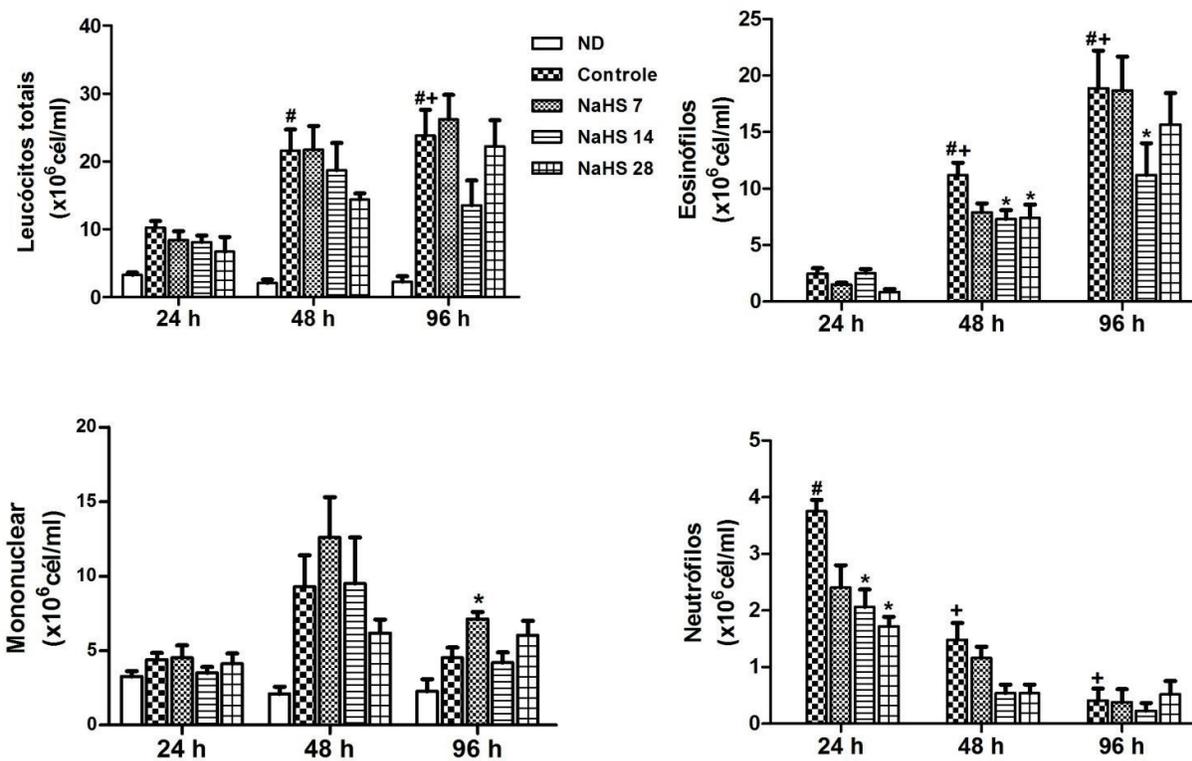
Utilizamos o NaHS, um doador de H<sub>2</sub>S, para avaliar os efeitos do H<sub>2</sub>S sobre a migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.

Para padronizar a dose de NaHS a ser utilizada, os camundongos sensibilizados foram tratados com NaHS nas concentrações de 7 µmol/Kg, 14 µmol/Kg e 28 µmol/Kg. O LBA foi recolhido em 24h, 48h e 96h após o desafio com OVA, como mostra a figura 2.

Quando comparado com os camundongos controles, observou-se que o tratamento com o NaHS 7, 14 ou 28 µmol/kg não provocou modificações no conteúdo de leucócitos totais no LBA em 24h, 48h ou 96h após do desafio com OVA (figura 2).

A dose de 14 µmol/Kg de NaHS foi capaz de induzir uma redução da migração dos eosinófilos para o LBA de camundongos em 48h, quando comparado ao grupo controle, enquanto que os tratamentos com as doses de 14 µmol/Kg e 28 µmol/Kg provocaram uma redução no número de neutrófilos em 24h após o desafio com OVA (figura 2). Os tratamentos não modificaram o número de células mononucleares em 24h ou 48h após o desafio e somente em 96h observou-se um aumento do número destas células quando os animais foram tratados com NaHS 7 µmol/kg (figura 2).

A concentração de 14 µmol/Kg foi escolhida para ser utilizada nos demais experimentos.



**Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de NaHS na contagem total e diferencial de leucócitos no LBA de camundongos.** Os camundongos sensibilizados foram sacrificados 24h, 48h e 96h após desafio com OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS nas doses de 7  $\mu\text{mol/Kg}$ , 14  $\mu\text{mol/Kg}$  e 28  $\mu\text{mol/Kg}$  meia hora antes do desafio. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 8 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  em relação ao grupo ND. + $p < 0,05$  em relação ao grupo controle 24h.

### **4.3 Comparação entre o efeito do tratamento com NaHS e 1400W sobre a migração de leucócitos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

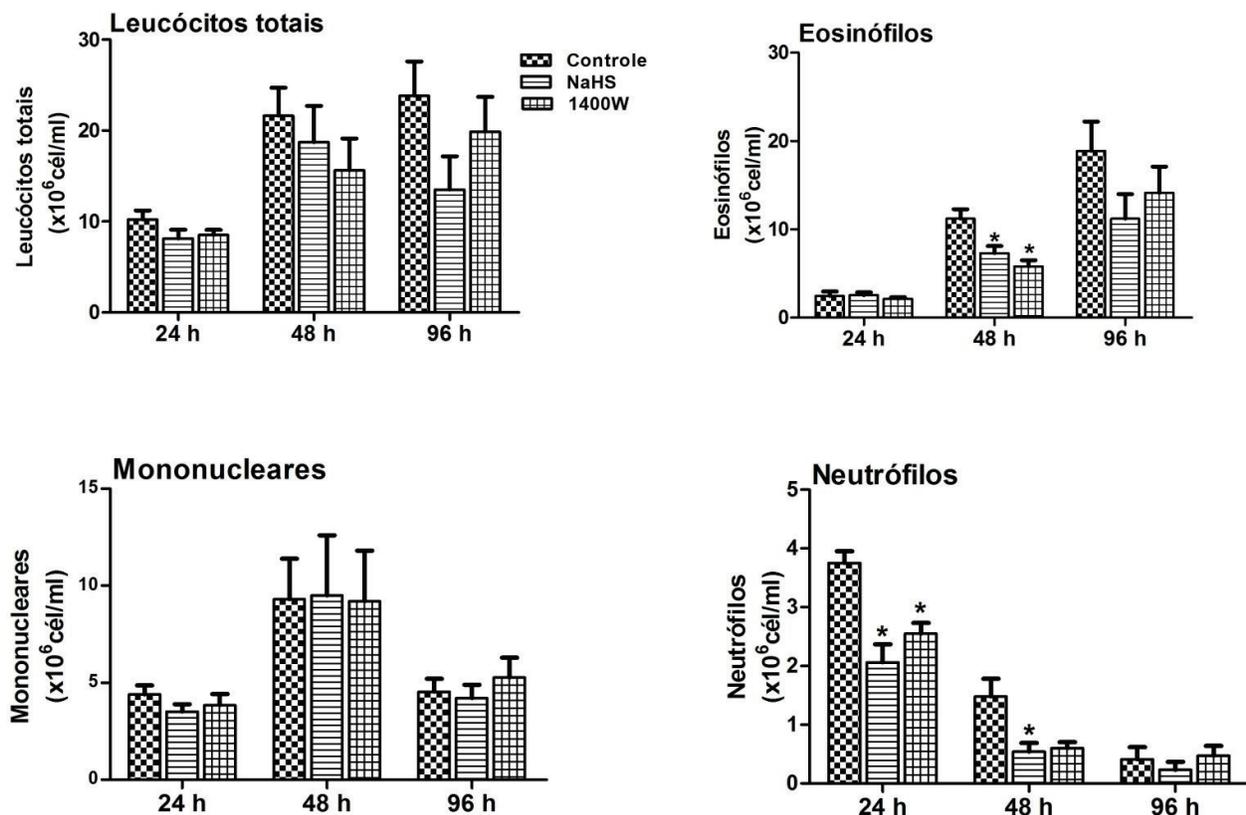
Para verificar o efeito dos tratamentos com NaHS 14  $\mu\text{mol/Kg}$  ou com 1400W 1 mg/Kg na cinética de migração das células inflamatórias para os pulmões de camundongos, foi coletado o LBA de camundongos sensibilizados não tratados (controles) ou tratados com as drogas em 24h, 48h e 96h após o desafio com OVA.

De um modo geral, a cinética do influxo de leucócitos totais, eosinófilos, células mononucleares e neutrófilos para os pulmões dos camundongos tratados com NaHS mostrou perfil semelhante ao observado nos animais tratados com 1400W, nos diferentes períodos após o desafio antigênico (figura 3).

Como mostrado na figura 3, nenhuma diferença foi observada no infiltrado de células totais ou de células mononucleares entre os grupos tratados com NaHS ou 1400W e o grupo controle nos períodos estudados.

Tanto o tratamento com NaHS como com 1400W provocou uma redução significativa na migração de eosinófilos para os pulmões de animais sensibilizados em 48h após o desafio com OVA, quando comparados com o respectivo grupo controle (figura 3).

O número de neutrófilos no LBA foi reduzido pelo tratamento com NaHS em 24h e 48h ou com o 1400W em 24h após o desafio, quando comparados aos respectivos controles (figura 3).



**Figura 3.** Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na migração dos eosinófilos para o LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o desafio com OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 8 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

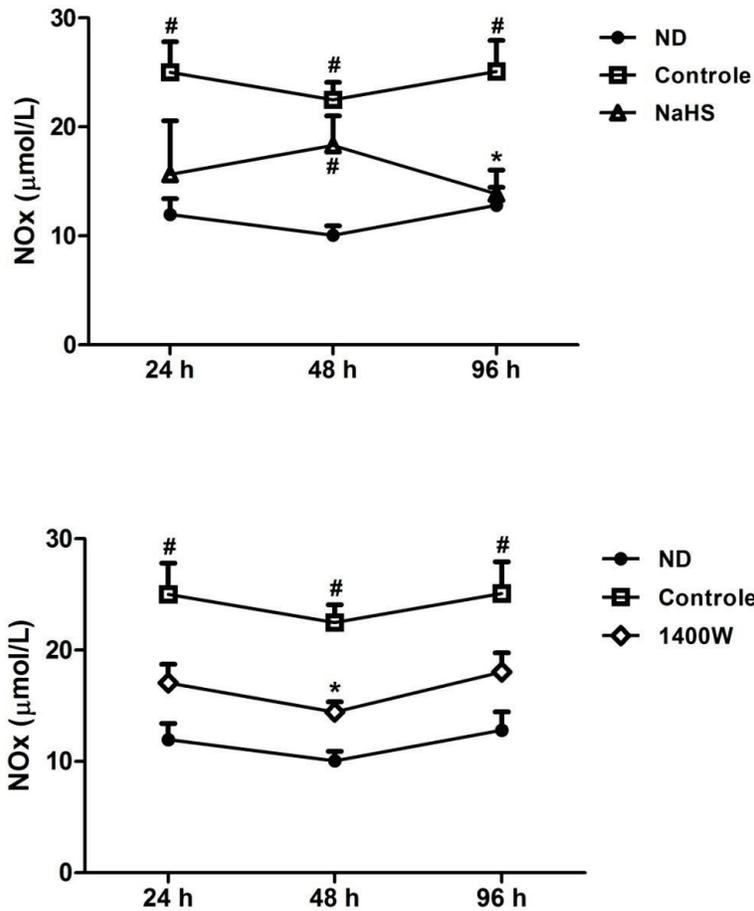
#### **4.4 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre os níveis de óxido nítrico total (NOx) no LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.**

Para avaliar os efeitos do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a produção de •NO nos pulmões realizamos a dosagem dos níveis de NOx no LBA de todos os grupos experimentais.

Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis pulmonares de NOx do grupo controle entre os horários de 24h, 48, e 96h após o desafio. No entanto, todos os valores estavam aumentados quando comparados ao grupo ND, como mostra a figura 4.

O tratamento com NaHS reduziu os níveis de NOx em 96h após o desafio com OVA, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado o tratamento com 1400W foi capaz de diminuir seus níveis em 48h (figura 4).

Nos demais períodos os tratamentos não provocaram alterações significativas nos níveis de NOx.



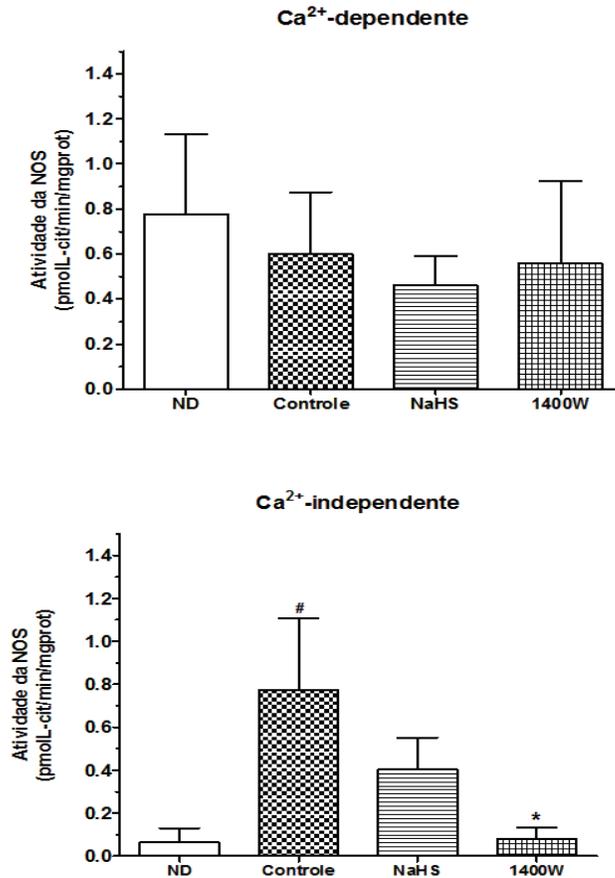
**Figura 4.** Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na produção de  $\dot{V}NO$  nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o desafio com OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. A produção de  $\dot{V}NO$  foi analisada pela verificação dos níveis de NOx conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 8 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. # $p < 0.05$  em relação ao grupo ND.

#### **4.5 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W nas atividades das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) no tecido pulmonar de camundongos**

A medida da atividade enzimática das NOS  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente e -independente foi verificada nos pulmões de camundongos ND, controles e tratados com NaHS ou 1400W.

Conforme a figura 5, a atividade das NOSs  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes não sofreu nenhuma alteração pelo desafio com OVA nem pelo tratamento com NaHS ou 1400W.

O desafio com OVA provocou no grupo controle um aumento da atividade da NOS  $\text{Ca}^{2+}$ -independente em 48h após o primeiro desafio, quando comparado ao grupo ND (figura 5). Neste período, o tratamento com 1400W provocou uma redução na atividade pulmonar desta isoenzima. Nenhum efeito foi verificado pelo tratamento com NaHS na atividade da NOS  $\text{Ca}^{2+}$ -independente (figura 5).



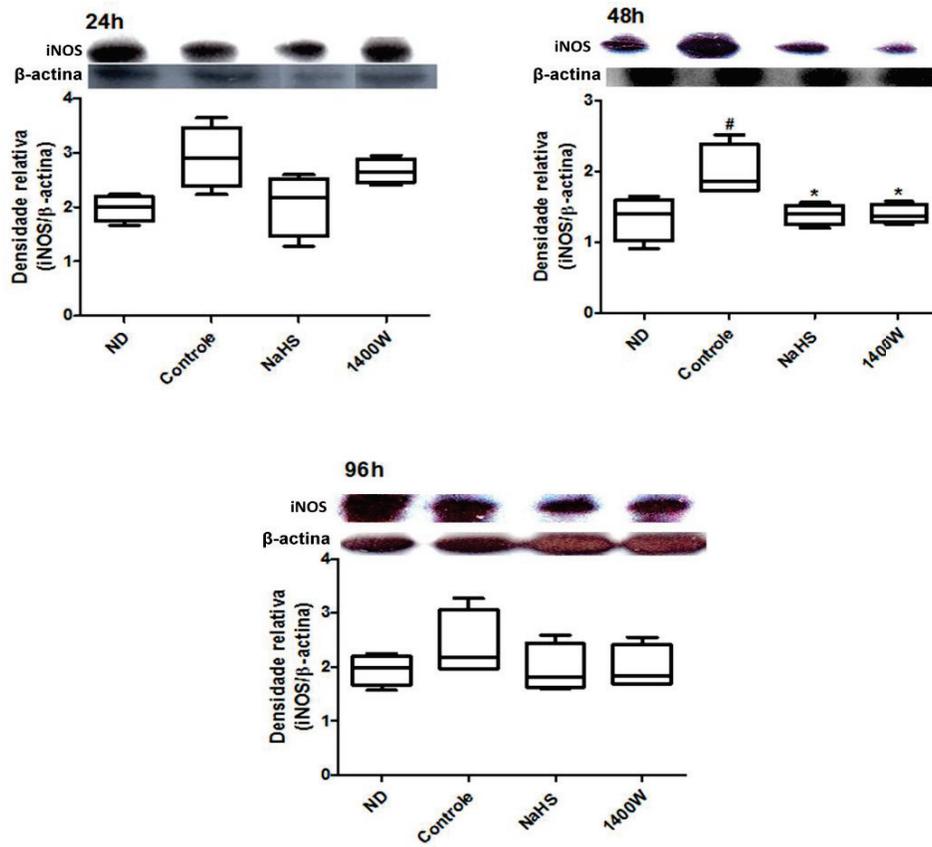
**Figura 5. Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na atividade das enzimas oxido nítrico sintases no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados em 48h após o desafio com OVA.** Os camundongos foram sacrificados 48h após o desafio com a OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. A atividade das enzimas foi verificada pela conversão de L-arginina em L-citrulina conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 6 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  em relação ao grupo ND.

#### **4.6 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na expressão de iNOS nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

Conforme mostrado na figura 6, a análise da expressão da iNOS demonstrou que o desafio com OVA provocou um aumento na expressão da iNOS do grupo controle em 48h após o desafio, quando comparado ao grupo ND.

Neste mesmo período, tanto o tratamento com NaHS como o tratamento com 1400W provocou uma redução da expressão da iNOS, quando comparado ao grupo controle (figura 6).

Nenhuma modificação na expressão da iNOS pulmonar foi produzida pelo desafio com OVA ou pelos tratamentos com as drogas em 24h e 48h após o desafio com OVA.



**Figura 6. Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W na expressão da iNOS nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o desafio com a OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. A expressão da iNOS foi verificada por Western Blotting conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados são expressos em gráficos Box&Whiskers (mediana, IQR e valores mínimos e máximos da análise por western blotting) de 4 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  em relação ao grupo ND.

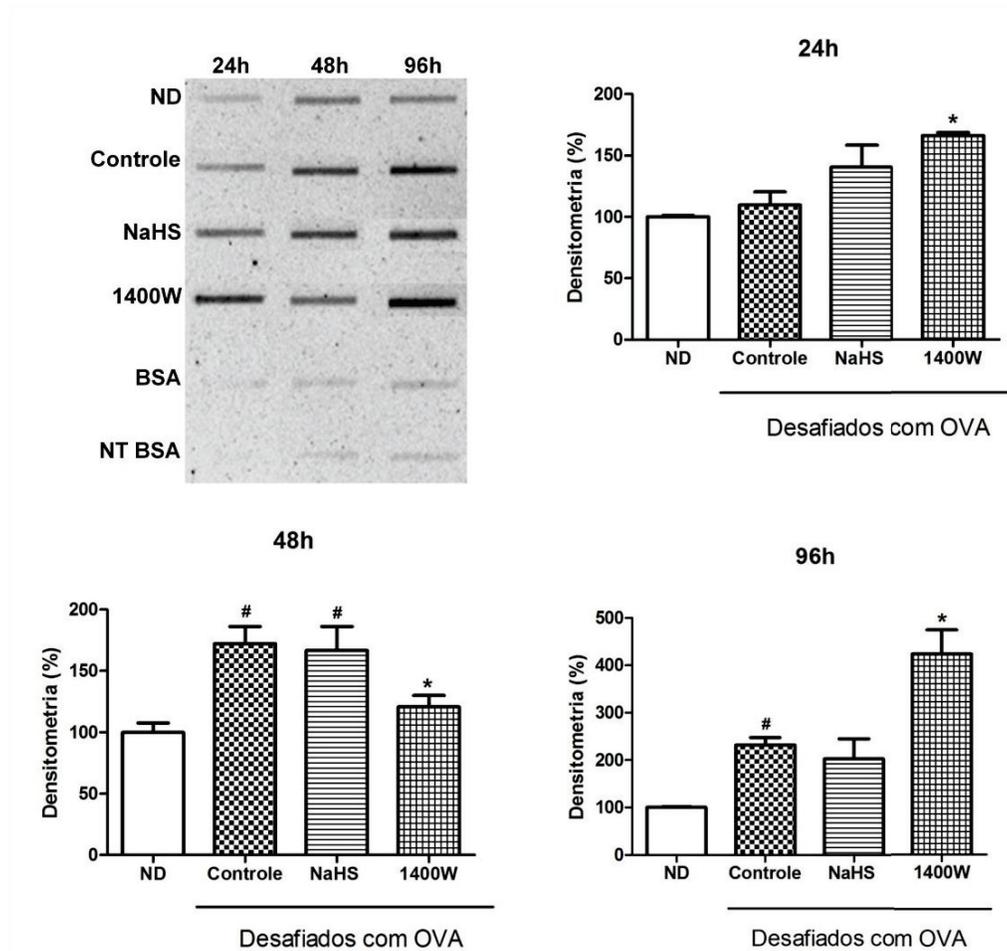
#### **4.7 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a nitração de tirosina nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

A nitrotirosina (3-NT) é um produto da nitração de tirosina, mediada por RNS, considerado um marcador inflamatório dependente de  $\bullet\text{NO}$ .

Conforme mostrado na figura 7, o desafio com OVA produziu um aumento de resíduos de 3-NT no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados em 48h e 96h após o primeiro desafio, quando comparado ao grupo ND.

O tratamento com NaHS provocou aumento da nitração de tirosina em 48h após o desafio com OVA quando comparado ao grupo ND (figura 7).

O tratamento com 1400W aumentou os resíduos de 3-NT em 24h, seguido por diminuição em 48h e acréscimo marcante em 96h, quando comparado aos respectivos controles (figura 7).

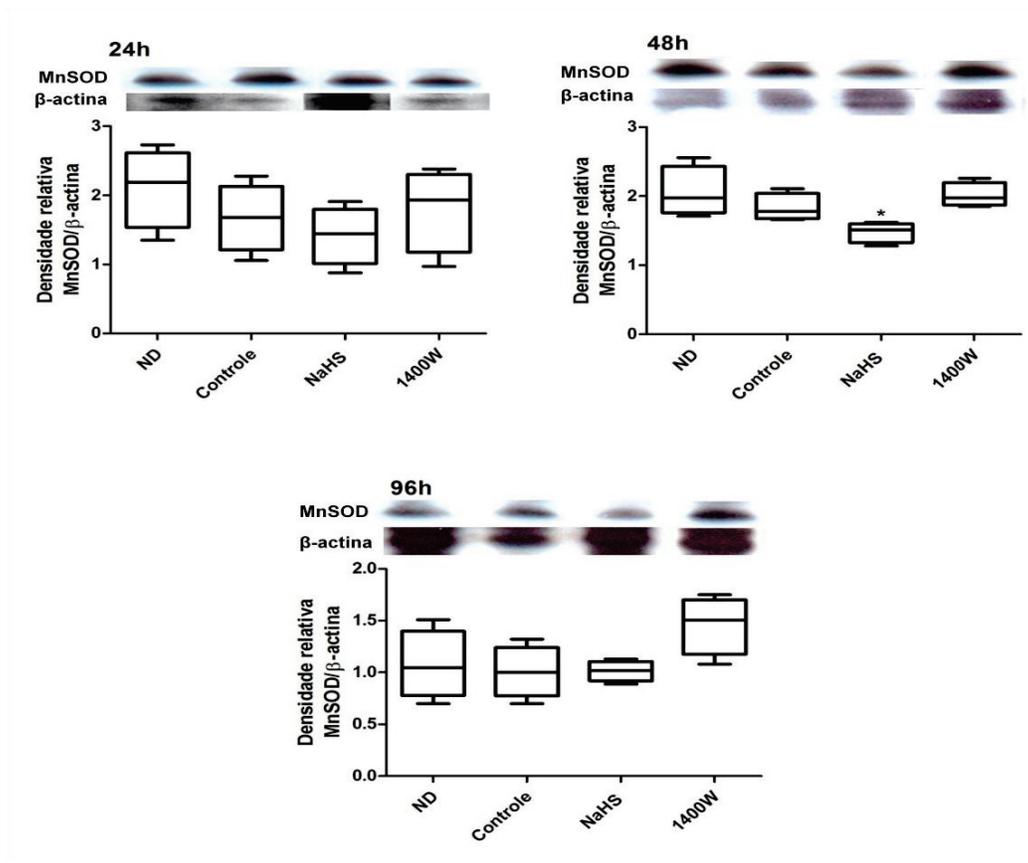


**Figura 7. Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a nitração de resíduos de tirosina nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o desafio com a OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. A análise da nitração de resíduos de tirosina foi feita por Slot Blot conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 6 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  em relação ao grupo ND.

#### **4.8 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão de MnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

Para avaliar se o tratamento com NaHS ou 1400W possui algum efeito no estresse oxidativo foi verificada a expressão da isoforma mitocondrial MnSOD da enzima antioxidante SOD nos pulmões de animais sensibilizados e desafiados com OVA.

Conforme mostra a figura 9, a análise da MnSOD demonstrou que em nenhum dos horários analisados o desafio com OVA ou o tratamento com 1400W modificou sua expressão. Uma redução da expressão da MnSOD foi produzida pelo tratamento com NaHS em 48h após o desafio com OVA.



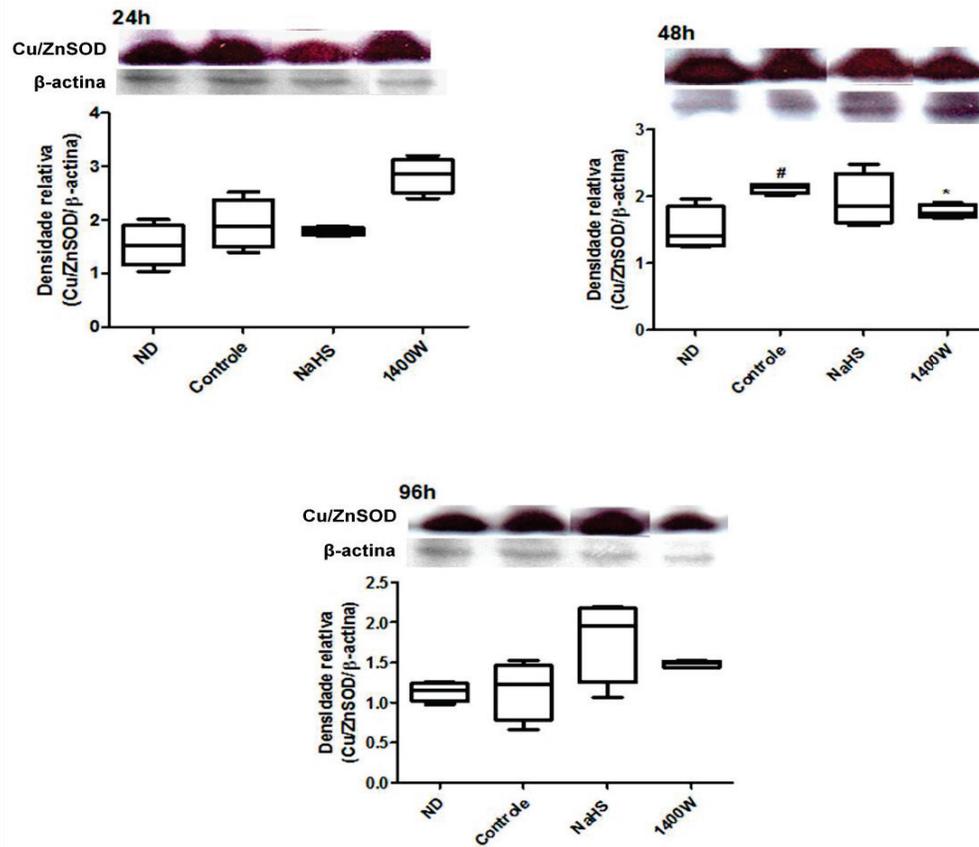
**Figura 8. Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão da MnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o primeiro desafio com a OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. A expressão da MnSOD foi verificada por Western Blotting como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados são expressos em gráficos Box&Whiskers (mediana, IQR e valores mínimos e máximos da análise por western blotting) de 4 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### **4.9 Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão da Cu/ZnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

A expressão da isoforma citoplasmática da enzima antioxidante SOD, a Cu/ZnSOD, foi avaliada nos pulmões de animais sensibilizados e desafiados com OVA, tratados ou não com NaHS e 1400W.

Conforme mostra a figura 10, a análise demonstrou que em 48h, o desafio com OVA provocou aumento da expressão da Cu/ZnSOD no grupo controle, quando comparado ao grupo ND. Neste mesmo período o tratamento com 1400W reduz a expressão da Cu/ZnSOD, quando comparado ao grupo controle.

O tratamento com NaHS não produziu efeito na expressão da Cu/ZnSOD em qualquer período estudado.



**Figura 9. Efeito do tratamento com NaHS ou 1400W sobre a expressão da Cu/ZnSOD nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.** Os camundongos foram sacrificados 24h, 48h e 96h após o desafio com a OVA. Os animais não desafiados (ND) foram sensibilizados com OVA, mas receberam somente salina sem a OVA na ocasião do desafio. Alguns animais receberam ou não (controles) tratamento com NaHS ou 1400W antes do desafio. A expressão da Cu/ZnSOD foi verificada por Western Blotting como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados são expressos em gráficos Box&Whiskers (mediana, IQR e valores mínimos e máximos da análise por western blotting) de 4 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$  em relação ao grupo ND.

## 5. Discussão

Estudos têm demonstrado que o gás sulfídrico H<sub>2</sub>S pode ter um importante papel em vários aspectos da fisiologia e da patologia de diferentes doenças. O fato do H<sub>2</sub>S estar envolvido em processos inflamatórios nos levou a estudar sua influência na inflamação alérgica pulmonar em camundongos e verificar se seus os efeitos poderiam ser decorrentes da interação com o <sup>•</sup>NO.

Uma das características marcantes da asma é o infiltrado pulmonar rico em células ativadas como eosinófilos, mastócitos e linfócitos (Feder et al., 1997; Ferreira et al., 1998 e 2004; Hamid & Tulic, 2009; Pelaquini et al., 2011).

No presente estudo, para verificar a cinética da migração dos leucócitos para o LBA, os animais foram sensibilizados e sacrificados em 24h, 48h e 96h após o desafio intranasal com OVA. De acordo com nossos resultados, os animais não desafiados (sensibilizados com OVA e que receberam salina intranasal sem a OVA na ocasião do desafio) não apresentaram eosinófilos no LBA em nenhum dos horários estudados, indicando que estas células não estavam presentes nos pulmões de animais não alérgicos. Estes resultados também foram observados em nossas pesquisas anteriores (Ferreira et al., 1998, 2002 e 2004 e Pelaquini et al., 2011) e também em outras que utilizaram linhagens de camundongos A/J (Iijima et al.; 2001) e C57BL/6 WT (Yu et al.; 2011). A análise do LBA dos animais controles sensibilizados e desafiados com OVA demonstrou a presença de eosinófilos nos pulmões a partir de 24h. Um aumento no número destas células foi observado em 48h, sendo que o maior influxo de eosinófilos ocorreu em 96h após o desafio alérgico. Estes resultados também foram verificados em outros estudos (Ferreira et al., 1998,

2002 e 2004; Underwood et al., 2002; Pelaquini et al., 2011) em modelos de ratos e camundongos alérgicos.

Estudos têm demonstrado que o H<sub>2</sub>S sintetizado endogenamente pode ter efeito modulador da resposta inflamatória em diferentes sistemas do organismo, inclusive nas vias aéreas (revisto por Lowicka e Beltowski, 2007). A indicação de um efeito antiinflamatório do H<sub>2</sub>S foi verificado em modelos de inflamação não alérgica, como observado por Zanardo et al. (2006) utilizando modelo de edema de pata em ratos e por Ekundi-Valentim et al. (2010) em modelo de sinovite de joelho em ratos.

Em nosso modelo experimental, verificamos inicialmente que o tratamento com H<sub>2</sub>S foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos sensibilizados em 24h e 48h e de eosinófilos em 48h após o desafio alérgico. Estes resultados estão de acordo com os observados por Chen et al. (2009) utilizando modelo de asma em ratos. Por outro lado, o efeito do H<sub>2</sub>S ao diminuir a migração dos neutrófilos pode ter relação com os efeitos benéficos deste gás na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), como demonstrado por Chen et al. (2005).

De maneira interessante, no presente estudo, a ação inibitória do influxo de eosinófilos para o pulmão dos camundongos alérgicos pelo tratamento com o NaHS foi semelhante à ação do 1400W. Este efeito decorrente do tratamento com o 1400W sobre a mobilização dos eosinófilos já tinha sido observado anteriormente em nossa pesquisas (Pelaquini et al., 2011) e também por outros pesquisadores (Iijima et al., 2001; Birrel et al., 2003). A verificação de que o tratamento com NaHS ou com 1400W, ou seja, que a presença do H<sub>2</sub>S ou a inibição da iNOS resultou no mesmo efeito sobre a migração do eosinófilo,

sugeriram um ação semelhante de ambos os mediadores sobre os mecanismos que determinam o influxo desta célula para o pulmão. Além disto, o efeito do H<sub>2</sub>S poderia também ocorrer por mecanismos dependentes do <sup>•</sup>NO.

Na asma a principal isoenzima de NOS envolvida é a iNOS. Vários modelos animais de inflamação demonstram que o excesso de <sup>•</sup>NO derivado da iNOS tem um papel patológico que pode ser revertido pelo uso de diferentes inibidores da iNOS (revisto por Hesslinger et al., 2009). Com a proposta de investigar os mecanismos pelos quais o H<sub>2</sub>S inibe o infiltrado de eosinófilos nos pulmões dos camundongo alérgicos, verificamos a expressão da iNOS e sua atividade nos pulmões dos camundongos alérgicos em 48h após o desafio com OVA. Inicialmente, observamos que o desafio com OVA nos animais controles provocou um aumento da expressão da iNOS nos pulmões em 48h após o desafio com OVA. Estes resultados estão em concordância com os observados por Koarai et al.(2002) e Abe et al. (2006). Tanto o tratamento com NaHS como com o 1400W provocou uma redução da expressão da iNOS somente em 48h após o primeiro desafio com OVA, sugerindo que o H<sub>2</sub>S e o 1400W modulam esta isoforma de NOS nos pulmões dos camundongos alérgico no mesmo período em que regulam negativamente a mobilização dos eosinófilos.

A análise da atividade das NOS mostraram que a atividade da isoforma Ca<sup>+</sup> -dependente não foi alterada nem pelo desafio com OVA nem pelos tratamentos com NaHS ou 1400W, em 48h após o desafio com OVA. Por outro lado, neste mesmo período, a atividade da Ca<sup>+</sup> -independente foi aumentada nos pulmões dos camundongos controles, confirmando seu envolvimento na inflamação alérgica das vias aéreas. Esse resultado está de acordo com o observado por Trifilieff et al. (2000) e Abe et al. (2006). No entanto, o

tratamento com NaHS não produziu qualquer efeito sobre a atividade da NOS  $\text{Ca}^+$ -independente. Redução desta atividade somente foi produzida pelo tratamento com o inibidor da iNOS, o 1400W. Estes resultados são diferentes dos descritos por Chen et al. (2009), que observaram que o NaHS não produziu qualquer efeito na expressão, mas induziu diminuição da atividade da iNOS. O modelo de asma com exposição prolongada ao desafio com OVA (2 semanas) e/ou o tratamento com NaHS em ratos utilizado por estes autores pode ter contribuído para esta diferença de resultados.

Avaliamos, então, a produção de  $\text{NO}$  nos pulmões de camundongos alérgicos pela dosagem dos níveis de  $\text{NO}_x$  no sobrenadante do LBA. Verificamos nos animais controles que a produção de  $\text{NO}$  estava aumentada em todos os períodos estudados após o desafio alérgico, quando comparado ao grupo ND. Esses resultados condizem com o que foi visto por outros autores utilizando modelos experimentais de asma, como Koarai et al. (2002) e Ameredes et al. (2005) que verificaram a produção de  $\text{NO}_x$  e nitrito, respectivamente. Em nossa pesquisa, tanto o tratamento com o NaHS como com o 1400W foram capazes de modular a produção de  $\text{NO}_x$ , mas em diferentes horários após o desafio. O NaHS provocou uma inibição nos níveis de  $\text{NO}_x$  em 96h, enquanto o 1400W reduziu sua produção em 48h após o desafio com OVA, quando comparados ao grupo controle. Nos camundongos tratados com 1400W, os níveis diminuídos de  $\text{NO}_x$  coincidiram com o momento de maior inibição da migração de eosinófilos para o LBA, o que não foi observado nos animais tratados com NaHS. Portanto, nossos resultados indicaram que, provavelmente, o efeito do  $\text{H}_2\text{S}$  sobre o influxo de eosinófilo

para o pulmão pode-não ser decorrente de algum mecanismo relacionado ao  $\text{NO}$ .

A atividade da iNOS na produção do  $\text{NO}$  e a expressão desta proteína são moduladas por mecanismos diferentes. A regulação da expressão da iNOS varia em diferentes tipos de células, e é aumentada por citocinas e fatores pró-inflamatórios, como o  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ . A atividade depende da disponibilidade, regulação do transporte e consumo de arginina, além da presença do cofator tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ; revisto por Pautz et al., 2010). Este fato justifica a ausência de correlação entre a expressão e a atividade da iNOS que encontramos nos animais tratados com o NaHS.

Tem sido considerado que a formação da 3-nitrotirosina (3-NT), importante marcador do estresse oxidativo juntamente com outras espécies reativas de nitrogênio, pode causar uma variedade de efeitos patofisiológicos na asma (Saleh et al., 1998; Furukawa et al., 2011). Em nosso modelo experimental, o desafio com OVA produziu um aumento significativo de resíduos de 3-NT no tecido pulmonar dos camundongos controles em 24h e 48h. O tratamento dos camundongos com o 1400W provocou redução da expressão da 3-NT em 48h, concordando com os resultados de Iijima et al. (2001) utilizando 1400W e com Genovese et al. (2005) que utilizou outro inibidor específico da iNOS, o [(S)-2-Amino-(1-iminoetilamino)-5-tioheptanóico ácido]. Estes resultados sugerem que a inibição da síntese de  $\text{NO}$  reduziu a formação de 3-NT e, conseqüentemente, a inflamação alérgica ao diminuir o influxo de eosinófilos para o pulmão dos camundongos. No entanto, esta via não foi utilizada pelo  $\text{H}_2\text{S}$ , desde que os níveis de 3-NT nos camundongos tratados com NaHS estavam semelhantes aos observados nos controles.

Ekundi-Valentin et al. (2010) observaram efeitos semelhantes utilizando outro doador de H<sub>2</sub>S, o reagente de Lawesson, em modelo de sinovite em ratos.

Além dos produtos reativos de nitrogênio (RNS), o estresse oxidativo causado por uma gama de radicais livres derivados do oxigênio (ROS), como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas têm sido apontados como fatores relevantes na patogênese da asma (Lee et al., 2004). Enzimas antioxidantes, como as SODs intracelular Cu/ZnSOD e a mitocondrial MnSOD atuam como importantes componentes do sistema antioxidante de defesa contra radicais livres (Comhair e Erzurum, 2010).

No modelo experimental usado em nossas pesquisas, foi observado que o desafio com OVA nos camundongos controles não induziu qualquer alteração na expressão de MnSOD, mas provocou aumento da expressão da Cu/ZnSOD em 48h após do desafio alergênico. Neste mesmo período, a expressão da MnSOD foi diminuída pelo tratamento com NaHS, mas não pelo 1400W. Por outro lado, o tratamento com 1400W reduziu os níveis de Cu/ZnSOD. No entanto, de maneira semelhante ao observado por Abe et al. (2006), o NaHS não foi capaz de provocar qualquer alteração na expressão desta enzima.

A relação entre a atividade das SODs e a asma ainda não está totalmente elucidado. Resultados da literatura mostram que a atividade da SOD total estava diminuída em pacientes asmáticos comparados com os controles (Comhair et al, 2005). Nestes trabalhos, os autores sugerem que a inativação da SOD pode ser consequência de espécies reativas de nitrogênio gerados pela peroxidase dos eosinófilos, o que seria consistente com a noção de que o aumento do estresse oxidativo na asma levaria a maior inativação da SOD. No entanto, em amplo estudo utilizando asmáticos não foi encontrado diferenças

entre os níveis da proteína MnSOD entre pacientes asmáticos e indivíduos controles. A Cu/ZnSOD tende a ser mais elevada nos asmáticos, mas não se encontrou correlação com a severidade da asma (Comhair et al, 2005).

A Cu/ZnSOD, que constitui mais de 80-90% da atividade da SOD intracelular, é encontrada principalmente no citoplasma e é expressa no epitélio brônquico, macrófagos alveolares e endotélio dos capilares dos pulmões. Quando ativada, a Cu/ZnSOD acelera rapidamente a dismutação espontânea do radical superóxido, nitrta a tirosina em proteínas e cataliza a liberação de NO a partir de nitrosotióis (revisto por Comhair e Erzurum, 2010). Existem indicações de que a Cu/ZnSOD pode ser induzida por certos estímulos, mas no pulmão é a MnSOD mitocondrial a principal SOD a ser induzida, principalmente, por citocinas (revisto por Kinulla e Crapo, 2003).

Produtos oxidantes presentes na fumaça de cigarro, ozônio e citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 e 6 são capazes de aumentar a expressão do mRNA, os níveis da proteína ou a atividade da MnSOD em homogenato pulmonar e cultura de células pulmonares, como células epiteliais e macrófagos alveolares, granulócitos e células pulmonares malignas (revisto por Kinulla e Crapo, 2003). Por outro lado, a MnSOD pode ser inativada pelo peroxinitrito formado nos pulmões durante a inflamação na asma pela nitração dos resíduos de tirosina, necessários para sua atividade catalítica enzimática, a 3-NT (Yamakura et al., 1998). Estudos de Comhair et al. (2005) propõem que a inativação da SOD pode desencadear a apoptose das células epiteliais brônquicas *in vitro* ao aumentar os níveis de BAX e a clivagem e ativação da caspase-3.

Dados da literatura têm demonstrado que o H<sub>2</sub>S pode influenciar os níveis de citocinas envolvidas na expressão e atividade da MnSOD. Em modelo

de injúria pulmonar induzida por ácido oléico, foi observado que o tratamento dos ratos com NaHS diminuiu os níveis de IL-6 e 8, sugerindo que o H<sub>2</sub>S pode regular a resposta inflamatória pulmonar ao modular a síntese de citocinas (Li et al., 2007). Em outro modelo experimental usando o doador de H<sub>2</sub>S GYY4137 em cultura de macrófagos da linhagem RAW264.7, Whiteman et al. (2010) mostraram que este doador inibiu a liberação de IL-1beta, IL-6 e TNF-alpha. Em ambos os estudos, os doadores de H<sub>2</sub>S aumentaram a síntese de IL-10 pelos macrófagos (Whiteman et al.,2010)

Levando-se em conta os resultados acima descritos, podemos sugerir que a diminuição da expressão na MnSOD observada no homogenato pulmonar dos animais tratados com o NaHS pode ser decorrente da inibição de citocinas responsáveis pela ativação desta enzima em 48h após o desafio antigênico.

Os resultados deste trabalho demonstram que em nosso modelo experimental o efeito anti-inflamatório do H<sub>2</sub>S na asma ao inibir a migração de eosinófilos e neutrófilos para os pulmões não é decorrente da modulação da via do 'NO. Se a redução da expressão da MnSOD verificada nos animais tratados com NaHS está relacionada à apoptose de eosinófilos e/ou neutrófilos e, conseqüentemente, à diminuição do conteúdo destas células no LBA precisa ser verificado.

## 6. Conclusão

Os resultados deste trabalho demonstram que em nosso modelo experimental o efeito anti-inflamatório do H<sub>2</sub>S na asma ao inibir a migração de eosinófilos e neutrófilos para os pulmões não é decorrente da modulação da via do <sup>•</sup>NO. Se a redução da expressão da MnSOD verificada nos animais tratados com NaHS está relacionada à apoptose de eosinófilos e/ou neutrófilos e, conseqüentemente, à diminuição do conteúdo destas células no LBA precisa ser verificado.

## 7. Referências bibliográficas

Abe M, Hayashi Y, Murai A, Shibata K, Sakata N, Igarashi R, Katsuragi T, Tanaka K. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibitors on asthma depending on administration schedule. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40:1083-95.

Ameredes BT, Zamora R, Sethi JM, Liu HL, Kohut LK, Gligonic AL, Choi AM, Calhoun WJ. Alterations in nitric oxide and cytokine production with airwayinflammation in the absence of IL-10. *J Immunol*. 2005; 175(2):1206-13.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Aug;74(8):3203-7.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271(5 Pt 1):C1424-37.

Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. Role of hydrogensulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*. 2005; 19(6):623-5.

Birrell MA, McCluskie K, Haddad el-B, Battram CH, Webber SE, Foster ML, Yacoub MH, Belvisi MG. Pharmacological assessment of the nitric-oxide synthase isoforma involved in eosinophilic inflammation in a rat model of sephadex-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304(3):1285-91.

Blesa S, Cortijo J, Mata M, Serrano A, Closa D, Santangelo F, Estrela JM, Suchankova J, Morcillo EJ. Oral N-acetylcysteine attenuates the rat pulmonary inflammatory response to antigen. *Eur Respir J*. 2003; 21(3):394-400.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*. 1976;7:248–254.

Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide--mediated cytoprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(10):1203-17.

Chen YH, Wu R, Geng B, Qi YF, Wang PP, Yao WZ, Tang CS. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine*. 2009; 45:117-123.

Chen YH, Yao WZ, Geng B, Ding YL, Lu M, Zhao MW, Tang CS. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest*. 2005; 128(5):3205-11.

Comhair SA and Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283:L246–L255.

Comhair SA, Bhatena PR, Dweik RA, Kavuru M, Erzurum SC. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet*. 2000; 355(9204):624.

Comhair SA, Erzurum SC. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(1):93-124.

Comhair SA, Ricci KS, Arroliga M, Lara AR, Dweik RA, Song W, Hazen SL, Bleecker ER, Busse WW, Chung KF, Gaston B, Hastie A, Hew M, Jarjour N, Moore W, Peters S, Teague WG, Wenzel SE, Erzurum SC. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(3):306-13.

Comhair SA, Xu W, Ghosh S, Thunnissen FB, Almasan A, Calhoun WJ, Janocha AJ, Zheng L, Hazen SL, Erzurum SC. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am J Pathol*. 2005; 166(3):663-74.

Dugo L, Marzocco S, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effects of GW274150, a novel and selective inhibitor of iNOS activity, in acute lung inflammation. *Br J Pharmacol*. 2004; 141(6):979-87.

Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax*. 2000; 55 (Suppl 2):S51-S53.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol*. 2010; 159(7):1463-74.

Esechie A, Kiss L, Olah G, Horváth EM, Hawkins H, Szabo C, Traber DL. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. *Clin Sci (Lond)*. 2008; 115(3):91-7.

Feder LS, Stelts D, Chapman RW, Manfra D, Crawley Y, Jones H, Minnicozzi M, Fernandez X, Paster T, Egan RW, Kreutner W, Kung TT. Role of nitric oxide on eosinophilic lung inflammation in allergic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol*. 1997; 17:436-442.

Ferreira HHA, Bevilacqua E, Gaglioti SM, De Luca IM, Zanardo RC, Teixeira CE, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 1998; 358:253-259.

Ferreira HHA, Costa RA, Jacheta JM, Martins AR, Medeiros MV, Macedo-Soares MF et al. Modulation of eosinophil migration from bone marrow to lungs of allergic rats by nitric oxide. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68:631-639.

Ferreira HH, Lodo ML, Martins AR, Kandratavicius L, Salaroli AF, Conran N, Antunes E, De Nucci G. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. *Eur J Pharmacol*. 2002; 442(1-2):155-62.

Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M.  
Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol.* 2010; 184(4):1663-74.

Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL. Enhanced activity of a hydrogen sulphide releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol.* 2007; 150(8):996-1002.

Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Ishii K, Schmidt HH, Heller M, Murad F.  
Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol.* 1990; 38(1):7-13.

Furukawa K, Sugiura H, Matsunaga K, Ichikawa T, Koarai A, Hirano T, Yanagisawa S, Minakata Y, Akamatsu K, Kanda M, Nishigai M, Ichinose M.  
Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia. *Respir Res.* 2011; 12:81.

Geng B, Cui Y, Zhao J, Yu F, Zhu Y, Xu G, Zhang Z, Tang C, Du J.  
Hydrogensulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(4):R1608-18.

Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Failla M, Mazzon E, Sortino MA, Frasca G, Gili E, Crimi N, Caputi AP, Vancheri C. Inhibition or knock out of inducible

nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury. *Respir Res.* 2005; 6:58.

Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 1996; 268:237–246.

Haile S, Lefort J, Joseph D, Gounon P, Huerre M, Vargaftig BB. Mucous-cell metaplasia and inflammatory-cell recruitment are dissociated in allergic mice after antibody- and drug-dependent cell depletion in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(5):891-902.

Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of Asthma. *Annu Rev Physiol.* 2009; 71:489-507.

Heiss LN, Lancaster JR Jr, Corbett JA, Goldman WE. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(1):267-70.

Hesslinger C, Strub A, Boer R, Ulrich WR, Lehner MD, Braun C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37:886–891.

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(6):872-97.

Ichinose M. Differences of inflammatory mechanisms in asthma and COPD. *Allergol Int.* 2009; 58(3):307-13.

Iijima H, Duguet A, Eum SY, Hamid Q, Eidelman DH. Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(5):1233-40.

Jeong SO, Pae HO, Oh GS, Jeong GS, Lee BS, Lee S, Kim du Y, Rhew HY, Lee KM, Chung HT. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345(3):938-44.

Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2010; 11(7):577-84.

Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 15;167(12):1600-19

Koarai A, Ichinose M, Sugiura H, Tomaki M, Watanabe M, Yamagata S, Komaki Y, Shirato K, Hattori T. iNOS depletion completely diminishes reactive nitrogen-species formation after an allergic response. *Eur Respir J.* 2002; 20(3):609-16.

Kroegel C, Virchow JC, Luttmann W, Walker C, Warner JA. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (part I). *Eur Respir J* 1994; 7:519.

Lampinen M, Carlson M, Häkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 2004; 59(8):793-805.

Lee YC, Lee KS, Park SJ, Park HS, Lim JS, Park KH, Im MJ, Choi IW, Lee HK, Kim UH. Blockade of airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma by a prodrug of cysteine, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid. *FASEB J*. 2004; 18:1917-1919.

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*. 2005; 19(9):1196-8.

Li T, Zhao B, Wang C, Wang H, Liu Z, Li W, Jin H, Tang C, Du J. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233(9):1081-7.

Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep*. 2007; 59, 4-24.

Moncada S.; Palmer R. M. J.; Higgs E. A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43:109-42.

Moulin FJ, Brenneman KA, Kimbell JS, Dorman DC. Predicted regional flux of hydrogen sulfide correlates with distribution of nasal olfactory lesions in rats. *Toxicol Sci.* 2002; 66(1):7-15.

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 153:1251-6.

Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010; 23(2):75-93.

Pelaquini EH, Guimarães LAF, Benetti LR, Fernandes LGR, Tamashiro WMSC, Conran N, Ferreira HHA. Role of the Mac-1 and VLA-4 integrins, and concomitant Th2-cytokine production, in nitric oxide modulated eosinophil migration from bone marrow to lungs in allergic mice. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11(2):204–211.

Puckett JL, George SC. Partitioned exhaled nitric oxide to non-invasively assess asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 163(1-3):166-77.

Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533(1-3):240-52.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004; 84(3):731-65.

Rodway GW, Choi J, Hoffman LA, Sethi JM. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. *Chron Respir Dis*. 2009; 6(1):19-29.

Salahudeen AK. Free Radicals in Kidney Disease and Transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 1999; 10:137-43.

Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J*. 1998; 12(11):929-37.

Saunders V, Breyse P, Clark J, Sproles A, Davila M, Wills-Karp M. Particulate matter-induced airway hyperresponsiveness is lymphocyte dependent. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(5):640-6.

Trifilieff A, Fujitani Y, Dugas B, Fuentes M, Bertrand C. Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors Suppress Airway Inflammation in Mice Through Down-Regulation of Chemokine Expression. *J Immunol*. 2000; 165:1526-33.

Underwood SL, Haddad el-B, Birrell MA, McCluskie K, Pecoraro M, Dabrowski D, Webber SE, Foster ML, Belvisi MG. Functional characterization and biomarker identification in the Brown Norway model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol*. 2002; 137(2):263-75.

Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(3):307-16.

Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002; 16(13):1792-8.

Wei HL, Zhang CY, Jin HF, Tang CS, Du JB. Hydrogen sulfide regulates lung tissue-oxidized glutathione and total antioxidant capacity in hypoxic pulmonary hypertensive rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2008; 29(6):670-9.

Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, Moore PK. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343(1):303-10.

Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(10):1147-54.

Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem.* 1998; 273(23):14085-9.

Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, Galli SJ. Identification of an IFN- $\gamma$ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest*. 2011; 121(8):3133-43.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006; 20(12):2118-20.

Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ. Inhibition of K(V) and K(Ca) channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol*. 1997; 272(2):H904-12.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001; 20(21):6008-16.

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**



Bragança Paulista, 18 de Novembro de 2008.

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Projeto de Pesquisa:** “Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível nos marcadores de estresse oxidativo e na inflamação alérgica pulmonar em camundongos”.

**Grupo:** III

**Autor(es):** Prof<sup>a</sup> Dra. Heloisa Helena de Araujo Ferreira

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**PROCOLO:** 002.11.08

Prezado(a) (s) Pesquisador(a) (s),

O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, da Universidade São Francisco, em reunião do dia **18/11/2008** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

Atenciosamente,

**Marcelo Lima Ribeiro**  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF  
Universidade São Francisco