



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**DAIANA CAMPOS**

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) NO  
ESTRESSE OXIDATIVO PULMONAR EM  
CAMUNDONGOS ALÉRGICOS**

***EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE (H<sub>2</sub>S) ON THE  
PULMONARY OXIDATIVE STRESS IN ALLERGIC  
MICE***

**Campinas, 2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

---

**EFEITO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) NO ESTRESSE  
OXIDATIVO PULMONAR EM CAMUNDONGOS ALÉRGICOS**

**ORIENTAÇÃO: Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira**

***EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE (H<sub>2</sub>S) ON THE PULMONARY  
OXIDATIVE STRESS IN ALLERGIC MICE***

**DAIANA CAMPOS**

Dissertação 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.

*Master dissertation presented to the Post graduation Programme of the School Medical Sciences of the University Campinas – UNICAMP to obtain the Master grade in Pharmacology.*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida por Daiana Campos, e orientada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "MH", written over a horizontal line.

Assinatura do Orientador

**Campinas, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

C157e Campos, Daiana, 1987-  
Efeito do sulfeto de hidrogênio (h<sub>2</sub>s) no estresse oxidativo pulmonar em camundongos alérgicos / Daiana Campos. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Sulfeto de hidrogênio. 2. Alergia. 3. Estresse oxidativo I. Ferreira, Heloísa Helena de Araújo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Effect of hydrogen sulfide (h<sub>2</sub>s) on the pulmonary oxidative stress in allergic mice.

**Palavras-chave em inglês:**

Hydrogen sulfide

Allergy

Oxidative stress

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestra em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Heloísa Helena de Araújo Ferreira [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Wothan Tavares de Lima

**Data da defesa:** 16-08-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

## Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

DAIANA CAMPOS

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Membros:

Professora Doutora Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Professora Doutora Sisi Marcondes Paschoal

Professor Doutor Wothan Tavares de Lima

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

Data: 16/08/2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Inflamação da Universidade São Francisco/Bragança Paulista, como parte do projeto de pesquisa “Efeito do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) no estresse oxidativo pulmonar em camundongos alérgicos”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## **DEDICATÓRIA**

---

Aos meus pais maravilhosos Eloi e Vera, ao Lucas meu querido irmão,  
pelo amor incondicional, pelos valores ensinados em minha vida  
e por acreditarem no meu ideal incentivando em todos  
os momentos, principalmente nos mais incertos.

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

A DEUS, por ter me concedido o dom  
e a vontade do aprendizado.

## **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. Heloísa Helena de Araújo Ferreira, primeiramente pela oportunidade e confiança em meu potencial e pela dedicação incondicional à orientação deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Sonia Aparecida Gurgueira, pela primordial colaboração neste projeto e orientação nas dosagens das enzimas antioxidantes;

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará e Prof<sup>a</sup> Dra. Soraia Kátia Pereira Costa, pela orientação dos experimentos feitos no Departamento de Farmacologia, ICB, USP, SP;

Ao Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi, por disponibilizar o Laboratório de Bioenergética, FCM, UNICAMP, para realização das dosagens das enzimas antioxidantes e uso do HPLC;

Ao doutorando Felipe Gustavo Ravagnani, pela colaboração nos experimentos com HPLC;

À Letícia Regina Benetti e aos amigos que passaram ou se encontram no Laboratório de Pesquisa em Inflamação e contribuíram na realização dos experimentos: Aline Silva, Cristiane Eloiza Venâncio Guedes, Edmar Henrique Pelaquini, Jackeline Amaral Mendes, Jamille Nogueira e Kléber Leilsson dos Santos;

Aos professores do programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia- FCM/ UNICAMP pelos ensinamentos durante as disciplinas;

Aos técnicos do Biotério da Universidade São Francisco: Srs. Lazine e Paulinho, pelo cuidado com os 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) pela bolsa de mestrado, que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

## SUMÁRIO

	PÁG
Lista de abreviaturas.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Asma.....	17
1.2 Eosinófilos e asma.....	19
1.3 Radicais livres estresse oxidativo e asma.....	20
1.4 Marcadores do estresse oxidativo.....	23
1.5 Defesas antioxidantes.....	25
1.6 Sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S).....	28
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais.....	34
3.2 Reagentes.....	34
3.3 Divisão dos grupos.....	34
3.4 Modelo de hipersensibilidade imediata em camundongos.....	35
3.4.1 Sensibilização e desafio antigênico com OVA.....	35
3.5 Tratamento com NaHS.....	35
3.6 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA).....	36
3.7 Homogeneização dos pulmões.....	36
3.8 Dosagem de proteína.....	37
3.9 Marcadores do estresse oxidativo.....	37
3.9.1 Atividade da aconitase.....	37
3.9.2 Atividade da fumarase.....	37
3.9.3 Peroxidação lipídica.....	38
3.10 Determinação das enzimas antioxidantes.....	39
3.10.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	39
3.10.2 Atividade da catalase.....	39

3.10.3 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	39
3.10.4 Atividade da glutathiona redutase (GR).....	40
3.11 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG).....	40
3.12 Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Efeito do tratamento com NaHS na migração de eosinófilos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	42
4.2 Avaliação da atividade da aconitase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA após tratamento com NaHS.....	44
4.3 Avaliação da atividade da fumarase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA após tratamento com NaHS.....	46
4.4 Efeito do tratamento com NaHS na peroxidação lipídica nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	48
4.5 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da superóxido dismutase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	50
4.6 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da catalase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	52
4.7 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da glutathiona peroxidase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	54
4.8 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da glutathiona redutase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	56
4.9 Efeito do tratamento com NaHS nos níveis da glutathiona reduzida e glutathiona oxidada nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.....	58

5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8. ANEXOS.....	80
I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

•OH - radical hidroxila

CAT - catalase

CBS - cistationina- $\beta$ -sintetase

CSE - cistationina- $\gamma$ -liase

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

GPx – glutaciona peroxidase

GR – glutaciona redutase

GSH – glutaciona reduzida

GSSG – glutaciona oxidada

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

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

LBA - lavado broncoalveolar

MDA – malondialdeído

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NaHS - hidrosulfeto de sódio

NO - óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion superóxido

O<sub>2</sub> – oxigênio *singlet*

OVA - ovalbumina

PBS - salina tamponada fosfatada

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1- Efeito do NaHS na migração de eosinófilos para os pulmões de camundongos.....	43
Figura 2- Efeito do tratamento com NaHS na atividade da aconitase nos pulmões de camundongos.....	45
Figura 3- Efeito do tratamento com NaHS na peroxidação lipídica nos pulmões de camundongos.....	49
Figura 4- Efeito do tratamento com NaHS na atividade da SOD nos pulmões de camundongos.....	51
Figura 5- Efeito do tratamento com NaHS na atividade da catalase nos pulmões de camundongos.....	53
Figura 6- Efeito do tratamento com NaHS na atividade da GPx nos pulmões de camundongos.....	55
Figura 7- Efeito do tratamento com NaHS na atividade da GR nos pulmões de camundongos.....	57
Figura 8- Efeito do tratamento com NaHS na concentração de GSH e GSSG nos pulmões de camundongos .....	59

## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1- Atividade da fumarase nos pulmões de camundongos sensibilizados e não desafiados (ND) ou desafiados com OVA e não tratados (controle) ou tratados com NaHS em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o desafio antigênico.....	47
---	----

## **RESUMO**

---

Diversos estudos mostram que o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) exerce importante papel em diferentes aspectos da fisiologia e da patologia pulmonar. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento com um doador de H<sub>2</sub>S no estresse oxidativo produzido pela inflamação alérgica pulmonar. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) e tratados com NaHS 30 minutos antes de cada desafio com OVA. Os animais sofreram eutanásia em 24h-144h após o desafio com OVA, quando foi coletado o lavado bronchoalveolar, para contagem total e diferencial de eosinófilos, e retirados os pulmões. Os pulmões foram homogeneizados para análise da atividade das enzimas aconitase (que possui relação inversa com a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracelular), fumarase, superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e para a verificação do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por método colorimétrico. Os níveis de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) foram determinados por cromatografia. Os resultados dos camundongos não tratados (controle) mostraram que o aumento do conteúdo de eosinófilos para os pulmões ocorreu como uma resposta bifásica entre 48h/96h e 144h após o desafio com OVA. Nestes horários, observamos no grupo controle redução na atividade da aconitase, que foi acompanhada do aumento da peroxidação lipídica (TBARS). A atividade da enzima SOD estava aumentada nestes animais a partir de 24h, seguida de uma redução em 144h, enquanto que as atividades das enzimas catalase e GR estavam aumentadas somente em 48h. Não foram observadas modificações na atividade da GPx, assim

como nos níveis de GSH e GSSG, em nenhum dos períodos estudados. O tratamento dos camundongos alérgicos com NaHS reduziu o infiltrado de eosinófilos em 48h e 144h após o desafio antigênico, recuperou a atividade da aconitase e reduziu a peroxidação lipídica, quando comparado aos controles. Nestes horários, o tratamento com o NaHS também aumentou as atividades das enzimas SOD, GPx e GR e os níveis de GSH. Diferente destes resultados verificou-se uma redução da atividade da catalase em 48h, quando comparado ao grupo controle. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o H<sub>2</sub>S exerce efeito benéfico na inflamação alérgica pulmonar ao inibir o recrutamento de eosinófilos para os pulmões. Do mesmo modo, produz um importante efeito no estresse oxidativo ao reduzir a peroxidação lipídica e a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracelular (determinado pela atividade da aconitase) e ao aumentar a atividade da SOD. As atividades das enzimas GPx e GR também estavam aumentadas contribuindo para o aumento de GSH. Deste modo, o NaHS (e provavelmente outros doadores de H<sub>2</sub>S) podem apresentar potencialmente importante uso terapêutico para o tratamento de doenças pulmonares caracterizadas pela presença de células inflamatórias e desbalanceamento do equilíbrio oxidante/antioxidante.

## **ABSTRACT**

Several studies show that the hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) plays an important role in different aspects of lung physiology and pathology. The aim of this study was to investigate a H<sub>2</sub>S-donor treatment on the oxidative stress produced by pulmonary allergic inflammation. BALB/c mice were sensitized with ovalbumin (OVA) and treated with NaHS, 30 minutes before each OVA-challenge. The animals were sacrificed at 24h-144h after challenge, when bronchoalveolar lavage was collected for total and differential eosinophils counts and the lungs were collected. The lungs were homogenized for aconitase (that has inverse correlation with intracellular O<sub>2</sub><sup>•-</sup> production), fumarase, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) enzymes analysis and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measurement by colorimetric methods. The determination of reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) levels were done by chromatography. The results from untreated (control) mice showed that an increase of eosinophil influx to the lungs happened as a biphasic response between 48h/96h and at 144h after OVA-challenge. At the same hours we observed in this group a reduction in aconitase levels that were accompanied by lipid peroxidation (TBARS) increase. The SOD activity was increased in control animals at 24h followed by reduction at 144h, whereas catalase and GR activities were increased only at 48h. There were no changes in GPx activity, neither in GSH nor in GSSG levels at any time- studied. NaHS-treatment reduced eosinophils infiltration at 48h and 144h after antigen challenge when it was observed a recovery in the aconitase activity and a decrease in TBARS lung contents as

compared to control mice. It was also observed in these times after antigen challenge increases in SOD, GPx as well as GR activities and in GSH levels. Differing from these results, NaHS-treatment reduced catalase activity at 48h, as compared to control group. In conclusion, our results suggest that NaHS exerts beneficial effect on allergic pulmonary inflammation by inhibiting the eosinophils recruitment to the lungs of mice after OVA-challenge. It also produces a significant effect on oxidative stress by reducing lipid peroxidation and intracellular  $O_2^{\bullet-}$  production (measured by aconitase activities) as well as by increasing SOD activity. The GPx and GR activities were also improved, and that could account for GSH increase. Therefore, NaHS (and probably others  $H_2S$  donors) may emerge as potentially useful therapeutic tools for treatment of lung diseases characterized by the presence of inflammatory cells and oxidant/antioxidant imbalance.

## **1. Introdução**

### **1.1 Asma**

A asma é a doença alérgica mais comumente encontrada na clínica médica, que afeta desde crianças até adultos. Há evidências que sua prevalência e morbilidade estão crescendo em todo o mundo (Subbarao et al., 2009). Estima-se que 300 milhões de pessoas no mundo sofram com a asma, chegando a atingir proporções de epidemia (Saunders et al., 2010). Atualmente, o grande desafio dos estudos relacionados com a asma é identificar os papéis dos vários mediadores e os mecanismos moleculares envolvidos na patofisiologia desta doença.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, onde a musculatura lisa brônquica se contrai em resposta a estímulos endógenos e exógenos. Este estreitamento pode ser decorrente da exposição às substâncias que provocam alergia, tais como pólen, ácaros, exposição à fumaça ou ao ar frio, e esta resposta pode ser exacerbada pelo estresse e a prática de exercícios físicos (revisto por Holgate, 2008).

Clinicamente, a asma pode ser classificada em asma ocupacional, não atópica e atópica (alérgica), sendo a forma atópica o tipo mais comum entre os pacientes. A asma atópica é uma reação de hipersensibilidade tardia do tipo I, onde seu principal mediador é o anticorpo IgE produzido por linfócitos B. A asma apresenta como característica, a inflamação crônica das vias aéreas com presença abundante de eosinófilos, mastócitos e linfócitos T. Estas células liberam mediadores que provocam broncoconstrição, secreção de muco e remodelamento das vias aéreas (revisto por Hamid e Tulic, 2009).

Após a inalação, os alérgenos entram em contato com a mucosa pulmonar e são capturados pelas células apresentadoras de antígenos, com as células dendríticas presentes no epitélio brônquico. Os alérgenos são processados em peptídeos pelas células apresentadoras de antígenos e apresentados em associação com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe II para o receptor de células T (TCR; Hammad e Lambrecht, 2008). As células TCD4<sup>+</sup> não ativadas (Th0) em resposta ao antígeno apresentado, podem se diferenciar em células Th1 e Th2, sendo que os aspectos fisiopatológicos da asma em resposta ao alérgeno têm sido relacionados às células Th2 (Larché et al., 2003; Lyakh et al., 2008).

As citocinas estão diretamente associadas às doenças alérgicas. A IL-4 e IL-13 produzidas pelas células Th2 ativam linfócitos B a secretarem os anticorpos IgE (revisto por Barnes, 2008). Em resposta a estímulos, os anticorpos IgE ligam-se aos seus receptores de alta afinidade, como o FcεRI, presente em mastócitos e basófilos e o FcεRII, presente nos eosinófilos. A subsequente ligação dos alérgenos ao complexo IgE-FcεR induz a desgranulação de vesículas citoplasmáticas liberando histamina e desencadeia 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 induzem alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, como 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 (revisado por Barnes, 2008). Como resultado, a asma apresenta como sintomas, dispnéia, sibilância, tosse e respiração curta e ofegante (Masoli et al., 2004).

## **1.2 Eosinófilos e asma**

Produzidos na medula óssea, os eosinófilos são células polimorfonucleares que estão envolvidas em numerosos processos inflamatórios, incluindo infecções bacterianas e virais, lesão tecidual, imunidade tumoral e doenças alérgicas (Hogan et al., 2008). Os eosinófilos são formados a partir de células progenitoras CD34+ e se diferenciam sob a ação das IL-3 e IL-5 e do fator estimulante de colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) em células maduras que possuem características típicas como, núcleo bilobado e grânulos que possuem afinidade por corantes ácidos, como a eosina (Lampinen et al., 2004).

Nos grânulos dos eosinófilos são encontradas proteínas granulares citotóxicas como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e a peroxidase eosinofílica (EPO). Em resposta a estímulos, os eosinófilos migram para os tecidos onde sofrem desgranulação e liberação de suas proteínas granulares citotóxicas, além de secretarem vários mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos como o fator ativador de plaquetas (PAF) e leucotrienos. Os eosinófilos também liberam no tecido pulmonar espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); e ácido hipocloroso (HOCl), além de fatores de crescimento como o fator

transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e alfa (TGF- $\alpha$ ), conferindo a estas células importante papel nos danos teciduais e sintomas na asma (Hogan et al., 2008).

Estudos presentes na literatura utilizando modelos experimentais de asma mostram uma grande infiltração de eosinófilos nos pulmões de animais sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA; Feder et al., 1997; Ferreira et al., 1998 e 2004; Haile et al., 1999; Iijima et al., 2001; Koarai et al., 2002; e Pelaquini et al., 2011), indicando sua relevante participação na patogênese na asma.

### **1.3 Radicais livres estresse oxidativo e asma**

Os radicais livres são moléculas que contêm um ou mais elétron livre em sua órbita externa, situação que os torna altamente instáveis e muito reativos, apesar de apresentarem meia vida muito curta. Eles podem ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas e o seu alvo celular está relacionado ao seu sítio de formação (Halliwell e Gutteridge, 1984).

Os radicais livres (RL) são divididos de acordo com os elétrons centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio e são denominados, respectivamente, de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). Existem substâncias, como o peróxido de hidrogênio, que não são consideradas RL, por não apresentarem elétrons livres em sua órbita mais externa, mas que são altamente reativas e que podem ser convertidas em RL e são denominadas de espécies pré-radical livre (Meneghini, 1988). As principais ERO são o oxigênio singlet ( $O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais

hidroxilas ( $\cdot\text{OH}$ ). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ; revisto por Ricciardolo et al., 2004).

A formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são formados no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células. Do mesmo modo, os radicais livres produzidos pelos macrófagos e neutrófilos é um importante mecanismo da resposta imune inata contra bactérias e fungos, produzindo ação lesiva a estes microorganismos (Salahudeen, 1999).

Atualmente, pesquisas têm demonstrado que interações entre células e fontes endógenas (peroxissomos, NADPH oxidase, xantina oxidase, mitocôndria e citocromo P-450) ou exógenas (radiação-, cigarro e solventes orgânicos) podem resultar em elevados níveis de ERO, como  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e ERN, como o  $\cdot\text{NO}$ , que juntos participam da patogênese da asma (revisto por Comhair e Erzurum, 2010).

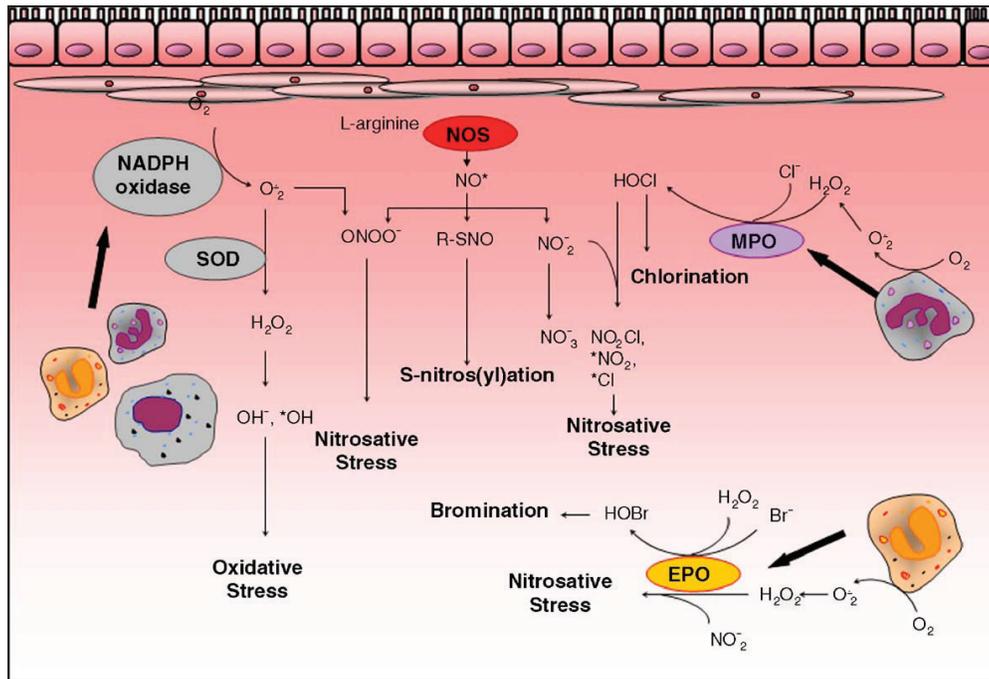
O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio de oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes. O acúmulo de radicais livres resulta em peroxidação lipídica, inativação enzimática, alteração do estado redox intracelular e dano de DNA nuclear e mitocondrial (Fridovich, 1998). Quando as células são expostas às ERO, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com o íon de ferro, na sua valência menor ( $\text{Fe II}$ ) no núcleo celular. No entanto, como a quantidade de  $\text{Fe II}$  é extremamente baixa no núcleo, esta reação ocorre quando um agente redutor celular transforma  $\text{Fe III}$  em  $\text{Fe II}$ . Uma espécie que exerce este papel é o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Esta reação, conhecida

como reação de Fenton, apresenta o mecanismo pelo qual as espécies  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  geram, no núcleo, o radical  $\bullet OH$ , uma espécie extremamente reativa que leva a morte celular (Meneghini, 1988).

Células inflamatórias que migram para as vias aéreas de pacientes asmáticos têm total capacidade de produzir ERO (Lee et al., 2004). A ativação de eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos geram  $O_2^{\bullet-}$  através do complexo NADPH oxidase de membrana. A dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  produz  $H_2O_2$ , que podem interagir com outras moléculas formando potentes radicais citotóxicos. O radical  $\bullet OH$ , um poderoso oxidante, pode ser produzido a partir do  $O_2^{\bullet-}$  e ácido hipocloroso ou ácido hipobromoso (HOCl ou HOBr), que são formados a partir do  $H_2O_2$  e um haleto de cloro ( $Cl^-$ ) ou bromo ( $Br^-$ ). Esta reação é catalisada pela mieloperoxidase (MPO) do neutrófilo e monócito ou pela EPO do eosinófilo, que possui maior afinidade com o  $Br^-$ . Entretanto, o dano oxidativo causado pelos eosinófilos é maior quando comparado com o neutrófilo, porque o conteúdo de EPO nos eosinófilos é 2-4 vezes maior que a quantidade de MPO no neutrófilo, resultando na maior capacidade de produzir  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (revisto por Dworski, 2000).

No processo inflamatório, além do aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$ , há também aumento dos níveis de  $\bullet NO$ . A interação entre o  $\bullet NO$  e o  $O_2^{\bullet-}$  resulta na formação do potente oxidante  $ONOO^{\bullet-}$  que induz a formação de resíduos de nitrotirosina. Além do  $ONOO^{\bullet-}$ , muitas outras ERN podem ser geradas a partir da interação do  $\bullet NO$  com o  $O_2^{\bullet-}$ . O  $NO_2^-$ , derivado do  $\bullet NO$ , em associação com o HOCl, pode ser utilizado pela MPO ou EPO para formar o  $NO_2Cl$  (cloreto nitroso) e

NO<sub>2</sub> (dióxido de nitrogênio), além de produzir a nitração da tirosina. Deste modo, altas concentrações de ERO e ERN podem ocasionar uma variedade de efeitos patofisiológicos que caracterizam a asma, como visto no esquema 1.



**Esquema 1. Formação dos principais radicais livres envolvidos na asma** (Ricciardolo et al., 2006).

#### 1.4 Marcadores do estresse oxidativo

A peroxidação de lipídeos é uma reação desencadeada pelos radicais livres, iniciada pelo radical \*OH, que age sobre a cadeia de ácidos graxos da membrana fosfolipídica. A peroxidação lipídica é dividida em duas fases. Na fase de iniciação, ocorre à auto-oxidação de cadeias laterais de ácidos graxos poli-insaturados mediante a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno. Após esta fase, forma-se um radical lipídeo-carbono que reage com a cadeia

lateral do ácido graxo poli-insaturado adjacente, sendo esta a fase de propagação (Aruoma et al., 1989). O produto final da degradação dos ácidos graxos é o malondialdeído (MDA), que possui ação citotóxica e pode ser quantificado pela reação com o ácido tiobarbitúrico - TBARS (Halliwell e Chirico, 1993).

Estudos têm relacionado a aconitase como um importante marcador do estresse oxidativo (Evelson et al., 2000; Miguel et al., 2009). Esta enzima está presente no citoplasma e nas mitocôndrias, onde participa do ciclo do ácido cítrico catalisando a reação de conversão em dois estágios do isocitrato à cis-aconitato e possui uma importante sensibilidade ao  $O_2^{\bullet-}$ . Este radical livre converte a forma ativa da aconitase, que apresenta um centro  $[4Fe-4S]^{2+}$  na sua forma inativa, que apresenta um centro  $[3Fe-4S]^{1+}$ , permitindo que a mudança na atividade desta enzima possa ser usada como marcador na produção de  $O_2^{\bullet-}$  e também um importante marcador da ocorrência de estresse oxidativo (Gardner et al., 1994).

Do mesmo modo, a atividade da fumarase tem sido utilizada para verificar se o efeito na atividade da aconitase foi devido ao estresse oxidativo e não um efeito de dano global nas enzimas do ciclo do ácido cítrico (Gurgueira et al., 2002; Miguel et al., 2009). Esta enzima catalisa a reação de conversão do L-malato à fumarato e ao contrário da aconitase, é menos sensível à ação de  $O_2^{\bullet-}$  intracelular, pois, em eucariotos, ela não apresenta o centro  $[4Fe-4S]^{2+}$ , servindo deste modo como controle da ocorrência de estresse oxidativo e da ocorrência de dano celular global (Woods et al., 1986).

### 1.5 Defesas antioxidantes

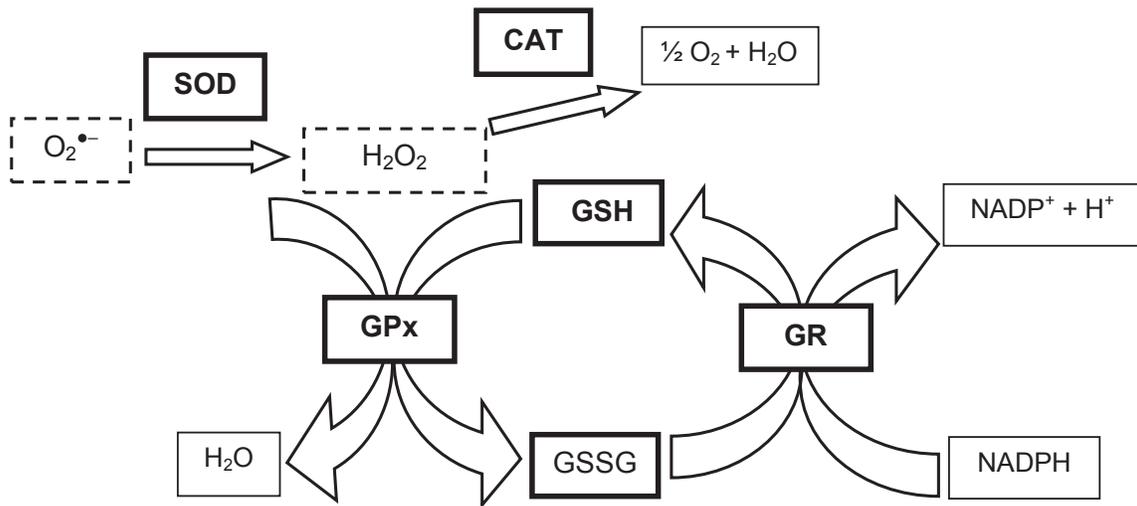
Normalmente, os pulmões possuem diversos mecanismos de defesa antioxidantes contra ERO e ERN, entre eles, as enzimas antioxidantes. A superóxido dismutase (SOD), a catalase e o sistema glutathione redox composto pelas enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) são algumas das principais enzimas do sistema enzimático antioxidante. Cada uma delas desempenha um papel específico no controle do balanço oxidativo (Fridovich.1998).

A SOD tem por função atuar na dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  convertendo-o em  $H_2O_2$  (Mccord e Fridovich. 1969). Três isoformas de SOD são reconhecidamente importantes. Entre elas a cobre-zinco SOD (CuZnSOD) é encontrada no citoplasma, núcleo e espaços intermembranas da mitocôndria, a SOD extracelular (EC-SOD), é encontrada principalmente em compartimentos extracelulares, tais como, plasma, linfa e líquido sinovial (Abe et al., 2006). A isoforma manganês SOD (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial, provê proteção vital contra ERO gerada através da hipóxia e cadeia transportadora de elétrons. A deficiência desta enzima resulta em um aumento de níveis de superóxido mitocondrial que inibe os complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons. O termo SOD é utilizado para designar atividade total de SOD, ou seja, as três isoformas em conjunto.

Comhair et al. (2000) descreveram que a atividade da SOD é menor nos pulmões de asmáticos, em comparação com controles saudáveis, e diminuída ainda mais durante um ataque asmático. Uma das causas da redução da SOD na asma é devida ao excesso de  $O_2^{\bullet-}$  nos pulmões inativando esta enzima (Heininger et al., 2005). Ao contrário, outros estudos mostram que a atividade e a

expressão da SOD estão aumentadas na asma para neutralizar o  $O_2^{\bullet-}$  nestes pulmões (Evelson et al., 2000 e Abe et al., 2006).

A catalase é uma hemoproteína localizada nos peroxissomas, catalisa a redução do  $H_2O_2$  em água e oxigênio. Esta enzima complementa a ação da SOD contra este tipo de ERO (Fridovich. 1998). A catalase se encontra presente também nas mitocôndrias de células musculares. A remoção de peróxidos também ocorre pela ação da GPx. Esta enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial catalisa a reação de redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  através da oxidação simultânea da glutathiona reduzida (GSH). Uma vez que mitocôndrias em geral não apresentam catalase, a GPx é muito importante para remoção de peróxidos nesta organela. Como mostrado no esquema 2, para restabelecer a glutathiona oxidada (GSSG) à forma de glutathiona reduzida (GSH), é necessário a ação da glutathiona redutase (GR) que consome simultaneamente NADPH (Fridovich. 1998).



**Esquema 2. Interação de enzimas antioxidantes.** Adaptado de Comhair e Erzurum. (2010).

A glutationa, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Halliwell e Gutteridge, 1984). A GSSG é formada a partir da oxidação de GSH por oxidantes, como o  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  que surgem durante condições de estresse oxidativo (Meister e Anderson, 1983; Zhao et al., 2009). Nas células o GSSG é reduzido de volta para GSH à custa de NADPH através da ação da enzima GR. No entanto, a síntese de GSH a partir dos seus aminoácidos constituintes é essencial para a elevação de seus níveis como uma resposta de adaptação ao estresse oxidativo. A GSH é sintetizada pela adição sequencial de cisteína ao glutamato seguido pela adição de glicina. A síntese de GSH envolve duas etapas enzimáticas catalisadas por glutamato cisteína ligase (GCL) e GSH sintetase (Meister e Anderson, 1983).

O grupo sulfidril (-SH) da cisteína está envolvido na redução e conjugação, sendo estas reações as mais importantes funções de GSH (Meister, 1992). Considerada um antioxidante intracelular, a GSH reduz hidroperóxidos orgânicos e peroxidação lipídica. A redução de seu nível é indicativa de lesão oxidante, presente em doenças inflamatórias pulmonares como a asma (Lee et al., 2004).

Normalmente, a glutationa está presente nos pulmões 90% na sua forma reduzida (GSH; Cantin et al., 1987; Smith et al., 1993; Comhair e Erzurum. 2002). Diferentes pesquisas têm mostrado que os níveis de GSH estão reduzidos na asma e os níveis de GSSG estão aumentados nesta patologia (Smith et al. 1993; De Raeve et al., 1997; Comhair e Erzurum. 2002). Comhair et al. (2000) mostraram que os níveis de GSH reduziram minutos após o desafio antigênico,

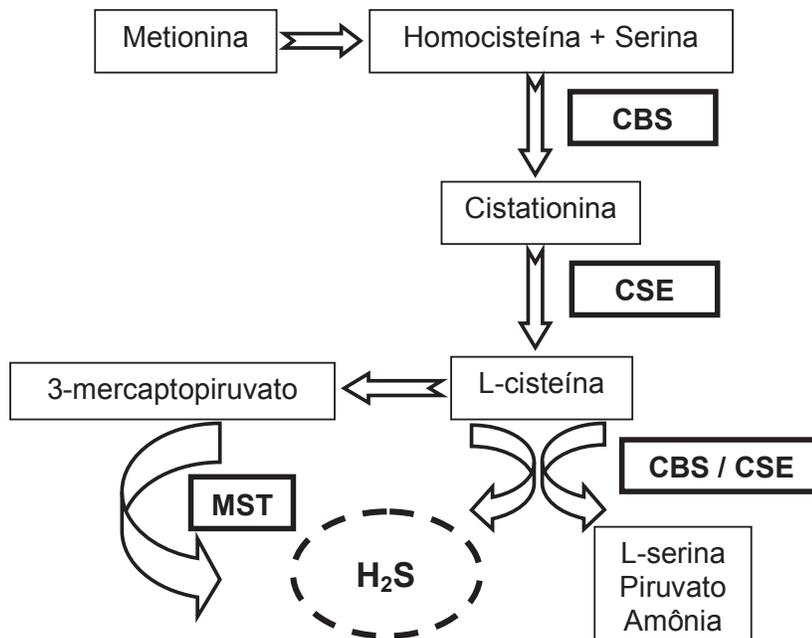
que foi acompanhado pelo aumento dos níveis de GSSG nos pulmões, o que acarretou na perda do potencial de redução nestes pulmões.

A redução dos níveis de GSH também contribui para o aumento da resposta Th2 na asma, decorrente do aumento da síntese da IL-4, responsável por induzir a diferenciação das células T para a subpopulação Th2, e redução dos níveis da IL-12, responsável pela diferenciação das células para a subpopulação Th1 (Peterson et al., 1998). A redução dos níveis de GSH também contribui para a apoptose das células pela ativação da proteína BAX e caspases (revisito por Comhair e Erzurum, 2010). Portanto, a manutenção dos níveis de GSH e das enzimas que atuam no seu metabolismo é essencial para a sobrevivência das células (Rahman et al., 1999).

### **1.6 Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

O H<sub>2</sub>S era conhecido tradicionalmente por ser apenas um gás tóxico no meio ambiente, cujo odor característico assemelha-se muitas vezes a ovo podre. Recentemente, foi nomeado como o terceiro gasotransmissor endógeno de importância farmacológica juntamente com NO e monóxido de carbono (CO; Szabo, 2007). Estudos têm mostrado que o H<sub>2</sub>S pode ter efeito no sistema cardiovascular, atuando na hipertensão arterial como vasodilatador via abertura de canais ATP sensível ao K no músculo liso vascular, no sistema respiratório, na inflamação exercendo efeito anti-inflamatório ou pró-inflamatório, no diabetes mellitus, além de seu envolvimento na resposta neuronal (revisito por Lowicka e Beltowski, 2007).

A síntese do H<sub>2</sub>S em tecidos de mamíferos é catalisada pelas enzimas cistationina γ- liase (CSE), cistationina β- sintetase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (MST; Chen e Wang, 2012). Nesta reação catalítica, as enzimas CBS e CSE utilizam a vitamina B6 como cofator. A síntese de H<sub>2</sub>S se inicia com o metabolismo do aminoácido homocisteína e com a transulfuração do aminoácido L- metionina. A homocisteína reage com a serina na reação catalisada pela CBS formando a cistationina, que é subsequentemente hidrolisada pela enzima CSE em cisteína, gerando amônia e cetobutarato. A cisteína pode ser hidrolisada pela CBS formando o H<sub>2</sub>S e L-serina ou, em reação de hidrólise catalisada pela CSE, gerando o H<sub>2</sub>S piruvato e amônia. A enzima MST catalisa a formação do H<sub>2</sub>S a partir do metabólito da cisteína, o 3-mercaptopiruvato, como visto no esquema 3.



**Esquema 3. Mecanismo de síntese do H<sub>2</sub>S in vivo. Adaptado de Chen e Wang. (2012).**

O H<sub>2</sub>S pode sofrer reação de oxidação, produzindo enxofre elementar (S), dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e sulfatos, tais como ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou, pode ser hidrolisado para hidrosulfetos, como o íon hidrosulfeto (HS<sup>-</sup>) e íons sulfeto (S<sup>2-</sup>; revisto por Wang, 2002). O H<sub>2</sub>S pode ser eliminado no plasma pela reação com a metahemoglobina ou, pode ser eliminado pela oxidação intracelular no citosol ou na mitocôndria. No citosol, este gás sofre metilação pela enzima tiol-S-metiltransferase, formando o composto metanotiol (CH<sub>4</sub>S; Levitt et al., 1999; Furne et al., 2001). Na mitocôndria, o H<sub>2</sub>S é oxidado a tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), sendo que esta reação está associada à cadeia transportadora de elétrons (Searcy et al., 1996).

Os efeitos do H<sub>2</sub>S no processo inflamatório são ainda contraditórios. Alguns estudos sugerem que o H<sub>2</sub>S exerce um papel protetor, enquanto outros demonstram o contrário. Estudo de Li et al. (2005) em modelo de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), mostraram aumento dos níveis plasmáticos de H<sub>2</sub>S, associado com o aumento da regulação da CSE. Esse mesmo estudo também mostrou que a administração com o doador do H<sub>2</sub>S, o sulfeto de sódio (NaHS), exerceu efeito pró-inflamatório e agravou o dano pulmonar, aumentando a atividade da mieloperoxidase e a concentração de TNF- $\alpha$ . Contrariamente, os estudos de Zanardo et al. (2006) mostraram que o H<sub>2</sub>S exerce efeito anti-inflamatório por reduzir o edema de pata induzido pela carragenina e a infiltração leucocitária em modelo utilizando ratos tratados com NaHS.

O efeito benéfico do H<sub>2</sub>S na inflamação também foi visto por Esechie 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 da citocina anti-inflamatória IL-10, que foi acompanhada pela redução da migração de células inflamatórias para o pulmão.

Chen et al. (2005) mostraram que os níveis de H<sub>2</sub>S 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 ou não. Em modelo de asma, Chen et al. (2009) verificaram que 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.

Estudos têm demonstrado que o H<sub>2</sub>S desempenha importante papel no estresse oxidativo, pois este gás é uma molécula altamente reativa podendo reagir especialmente com ERO e ERN. Quando reage com o  $\cdot$ NO, forma compostos nitrosotíois inativos, cuja estrutura química ainda não foi definida (Whiteman et al., 2006). Além do  $\cdot$ NO, já foi mostrado que o H<sub>2</sub>S reage com três diferentes ERO, com o O<sub>2</sub> $\cdot^-$ , o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e o ClO $\cdot^-$ , e com ERN como o ONOO $\cdot^-$  limitando os efeitos tóxicos destes radicais. Por isso, o H<sub>2</sub>S tem sido considerado um importante agente antioxidante no organismo (revisto por Lowicka e Beltowsky, 2007).

O H<sub>2</sub>S também pode ter efeito indireto no estresse oxidativo atuando de maneira benéfica ao modular as enzimas antioxidantes. Liu et al. (2009) mostraram em modelo de isquemia intestinal em ratos que o tratamento com o NaHS modulou positivamente a atividade da SOD e GPx, resultando na melhoria do quadro de lesão intestinal pela redução do estresse oxidativo. Estes resultados também foram vistos por Su et al. (2009) em modelo de cardiomiopatia em ratos,

onde o NaHS também aumentou a atividade da SOD e GPx, desenvolvendo um mecanismo protetor contra o estresse oxidativo.

Por outro lado, estudo de Kimura et al. (2004) indicou que o H<sub>2</sub>S possui ação na modulação do sistema glutathiona redox em modelo de estresse oxidativo em neurônios, induzido pelo glutamato em ratos. Neste estudo, o tratamento com o NaHS aumentou a GSH nos neurônios, desempenhando papel protetor no sistema nervoso. Este resultado foi atribuído ao efeito redutor do H<sub>2</sub>S, ou seja, o H<sub>2</sub>S reduziu a cistina em cisteína, principal precursora da GSH, e aumentou seu transporte para as células, o que produziu a amplificação da síntese deste antioxidante.

Sabendo que a asma é uma doença multifatorial e o estresse oxidativo desempenha um importante papel em sua fisiopatologia, investigamos neste trabalho se o H<sub>2</sub>S exógeno pode neutralizar os danos teciduais mediados pelo estresse oxidativo nos pulmões dos camundongos alérgicos.

## **2. Objetivos**

Investigar a influência do H<sub>2</sub>S no estresse oxidativo produzido pela inflamação alérgica pulmonar.

### **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). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade São Francisco com ciclos de claro-escuro de 12 horas, com umidade e temperatura controladas 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 (processo nº 0021108).

#### **3.2 Reagentes**

A ovalbumina (OVA), a droga hidrosulfeto de sódio (NaHS), o coquetel de inibidores de protease (P8340), o Kit para a dosagem de proteínas, a L-glutathiona reduzida e L-glutathiona oxidada e outros reagentes utilizados para o ensaio enzimático foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

#### **3.3 Divisão dos grupos**

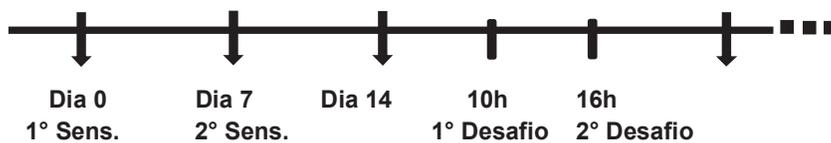
Os animais foram divididos em grupos da seguinte forma:

- 1) Não desafiados (ND): grupo sensibilizado com Ovalbumina Grau V (OVA) e que receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio.
- 2) Controle: grupo sensibilizado e desafiado com OVA.
- 3) NaHS: grupo sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com NaHS.

### 3.4 Modelo de hipersensibilidade imediata em camundongos

#### 3.4.1- Sensibilização e desafio antigênico com OVA

O modelo do experimento foi baseado em Haile et al. (1999). Os camundongos foram sensibilizados nos dias 0 e 7 por injeção subcutânea dorsal, com a solução de 100 µg de OVA adsorvida em 4 mg de hidróxido de alumínio - Al (OH)<sub>3</sub> – preparada em 400 µl de salina estéril. A partir do dia 14, os animais receberam desafios intranasais com 10 µg de OVA preparada em 50 µl de salina estéril duas vezes ao dia, sendo o primeiro desafio às 10:00 h e o segundo desafio às 16:00 h, conforme o esquema 1.

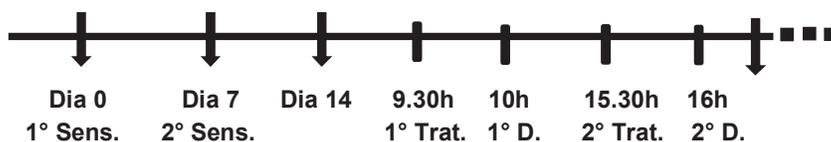


Esquema 1. Protocolo de sensibilização e desafio dos camundongos.

Sens. = Sensibilização.

### 3.5 Tratamento com o NaHS

O tratamento dos camundongos com o NaHS foi realizado baseado em Li et al. (2008). No dia 14, os animais receberam por via intraperitoneal, 400 µl de uma solução de NaHS 14 µmol/Kg dissolvidos em salina estéril. Conforme o esquema 2, os tratamentos foram administrados duas vezes ao dia trinta minutos antes dos desafios.



Esquema 2. Protocolo de tratamento dos camundongos com NaHS

Sens. = Sensibilização; Trat. = Tratamento; D. = Desafio.

### **3.6 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)**

Após os animais sofrerem eutanásia por dose excessiva de isoflurano em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio, a traquéia foi exposta e canulada com cateter intravascular periférico (20G). Em seguida, o LBA foi coletado pela lavagem de ambos os pulmões com 0,5 ml de salina estéril, injetados e aspirados três vezes, totalizando um volume de LBA aproximado de 1,5 ml. Imediatamente após a coleta do LBA, os pulmões foram retirados, congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80° C para posterior dosagem das atividades de enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo.

O LBA foi centrifugado a 1000xg por 10 minutos a 20° C, as células precipitadas foram ressuspensas em volume adequado de salina tamponada fosfatada contendo 2 mM de ácido etilenodiaminatetracético (PBS/EDTA 2 mM). A contagem das células totais foi realizada em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de eosinófilos, a concentração das células foi acertada para  $2 \times 10^6$  cél/ml com PBS/EDTA 2 mM e, posteriormente, foram confeccionados esfregaços em citocentrífuga e corados com Diff-Quick para análise no microscópio óptico.

### **3.7 Homogeneização dos pulmões**

Após o sacrifício dos animais, o lobo inferior direito (LID) dos respectivos pulmões foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio pH 7,4 (0,1M de tampão fosfato de potássio, 1M de cloreto de potássio (KCL), e 1mM de L-cisteína), acrescido com coquetel de inibidores de proteases 1% (Sigma, Protease

Inhibitor Cocktail). O homogenato pulmonar foi centrifugado a 800xg por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi alíquotado e rapidamente armazenado em freezer -80°C.

### **3.8 Dosagem de proteína**

A dosagem de proteínas totais nas amostras de homogenato pulmonar foi realizada pelo método descrito por Bradford et al. (1976). Esse método se baseia na formação de um complexo entre o corante azul G e as proteínas na solução, onde a absorção é proporcional à proteína presente na amostra. A concentração de proteína foi determinada utilizando a curva padrão de albumina bovina (BSA) nas concentrações (0,5 - 2,5 mg/ml). Foi realizada a leitura em 585 nm no leitor de microplacas (VERSAMAX, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

### **3.9 Marcadores do estresse oxidativo**

#### **3.9.1- Atividade da aconitase**

A atividade da aconitase foi determinada no homogenato pulmonar avaliando-se a formação do cis-aconitato a partir de isocitrato em 240 nm, na presença do tampão contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,6 mM de cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ) conforme descrito por Gardner et al. (1994). A atividade foi medida utilizando-se o espectrofotômetro UV/visível (Amersham Biosciences/ Ultrospec 2100 pro) e expressa em mU/mg de proteína.

#### **3.9.2- Atividade da fumarase**

Para análise da atividade da fumarase no homogenato pulmonar, se quantificou a velocidade de formação do fumarato a partir de L-malato em 240 nm, na presença de tampão contendo 30 mM de fosfato de potássio pH 7,4 e 0,1 mM de EDTA conforme descrito por Racker et al. (1950). A atividade foi determinada utilizando-se o espectrofotômetro UV/visível (Amersham Biosciences/ Ultrospec 2100 pro), sendo os valores de atividade expressos em U/mg de proteína.

### **3.9.3- Peroxidação lipídica**

A avaliação da peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo tem como princípio, a detecção de derivados lipoperóxidos na amostra por meio de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) por método colorimétrico, destacando-se o composto malondialdeído (MDA; Ohkawa et al., 1979).

Para este ensaio, foram utilizados 1,5 mg de proteína do homogenato pulmonar que foi tratado com 17,5% de ácido tricloroacético e 0,6% de ácido tiobarbitúrico pH 2,0. Após incubação em banho de água fervente por 15 minutos, observou-se a formação do produto corado. Fez-se então a adição de 70 % ácido tricloroacético e, incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 800xg por 15 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e submetido às leituras em 534 nm no espectrofotômetro UV/visível (Amersham Biosciences/ Ultrospec 2100 pro). A concentração de TBARS (nmol/mg proteína) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **3.10 Determinação das enzimas antioxidantes**

#### **3.10.1- Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada no homogenato pulmonar, pela redução da oxidação do citocromo c em 550 nm, conforme descrito por McCord e Fridovich. (1969), na presença de tampão 50 mM de fosfato de potássio pH 7,8, 0,5 mM de xantina e 5 mU de xantina oxidase. A atividade foi medida no espectrofotômetro (Amersham Biosciences/ Ultrospec 2100 pro) e foi expressa em U/mg de proteína.

#### **3.10.2- Atividade da catalase**

Para análise da atividade da catalase no homogenato pulmonar, se quantificou a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em 240 nm conforme descrito por Nelson e Kiesow. (1972), na presença de tampão 0,1 M de fosfato de potássio pH 7,0. A atividade foi medida no espectrofotômetro (Amersham Biosciences/ Ultrospec 2100 pro). Os valores de atividade foram expressos em mU/mg de proteína

#### **3.10.3- Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi determinada no homogenato pulmonar, pelo índice de oxidação do NADPH na presença de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR) e  $H_2O_2$  em 340 nm em tampão 50 mM de fosfato de potássio pH 7,8, conforme descrito por Lawrence et al. (1976). A atividade foi determinada utilizando-se o espectrofotômetro (Amersham Biosciences/ Ultrospec 2100 pro). A atividade foi expressa em U/mg de proteína.

### **3.10.4- Atividade da glutathiona redutase (GR)**

A atividade da GR foi determinada no homogenato pulmonar, pelo consumo de NADPH, conforme descrito por Carlberg et al. (1975), na presença de tampão 50 mM de fosfato de potássio pH 7.0, 0,05 M de EDTA, 6,5 mM de glutathiona oxidada (GSSG). Foi realizada a leitura em 340 nm a 37°C no leitor de microplacas (VERSAMAX, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). A atividade foi expressa em umol de NADPH/mg de proteína.

### **3.11 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)**

Os níveis de GSH e GSSG foram determinados conforme descrito por Yilmaz et al. (2009). Em resumo, após a homogeneização de 30 mg de pulmão, as proteínas foram precipitadas em tampão fosfato contendo 50 mM de perclorato de sódio (NaClO<sub>4</sub>) e 10 mM de EDTA e solução de ácido metafosfórico (5% v/v). As amostras foram centrifugadas a 8000xg durante 10 minutos (4° C) e os sobrenadantes foram injetados no sistema cromatográfico Shimadzu utilizando comprimento de onda de 215 nm com fluxo de 1,1 ml em gradiente isocrático linear de acetonitrila (1,0% em 20 min) no tampão fosfato (pH 2,8). Quarenta microlitros da amostra foram injetados numa coluna analítica (Phenomenex 150 x 4,6 mm; Hydro-RP 80A). O gradiente de solvente e separação cromatográfica, integração, e quantificação foram controladas pelo software de cromatografia Shimadzu. As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas utilizando a curva padrão de GSH e GSSG em diferentes concentrações (5,0 µmol/L - 250

$\mu\text{mol/L}$ ). O tempo de retenção para GSH e GSSG foi de  $5,54 \pm 1,25$ , e  $13,59 \pm 2,87$  minutos, respectivamente.

### **3.12 Análise estatística**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de  $n$  experimentos e foram analisados pelo teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguida por post-test de Tukey. Foram considerados significativos valores de  $p < 0.05$ .

## **4. Resultados**

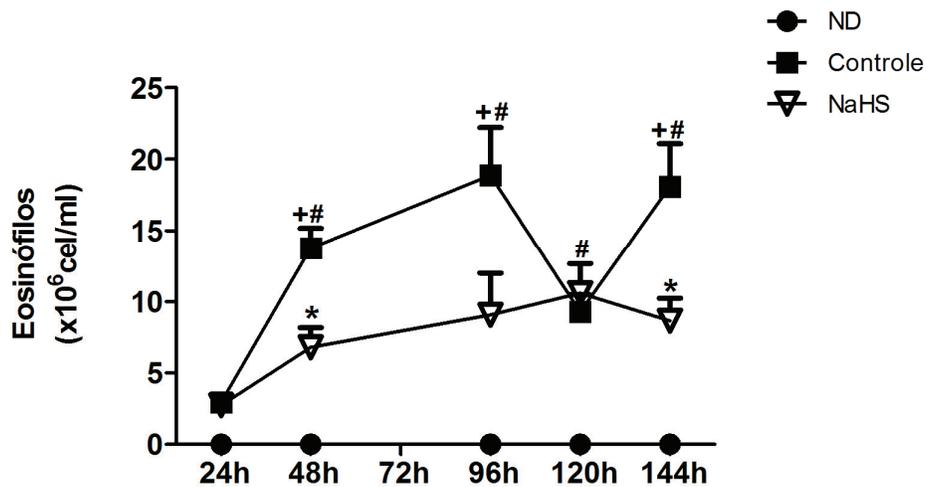
### **4.1 Efeito do tratamento com NaHS na migração de eosinófilos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

Para avaliar o efeito do tratamento na migração de eosinófilos para os pulmões, foram coletados os lavados broncoalveolares (LBA) dos camundongos dos grupos sensibilizados e desafiados com OVA que não foram pré-tratados com o NaHS (controle), assim como do grupo que foi tratado com a respectiva droga antes de cada desafio. Os LBA foram obtidos em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o desafio com OVA. Alguns animais sensibilizados com OVA receberam salina estéril sem a OVA na ocasião do desafio, sendo o grupo denominado de não desafiado (ND).

Conforme mostrado na Figura 1, não foram encontrados eosinófilos nos LBA do grupo ND em nenhum dos períodos estudados. Nos LBA do grupo controle, observou-se uma cinética crescente no número de eosinófilos a partir de 24h, sendo os maiores níveis observados em 96h e 144h após o desafio com OVA, comparado ao grupo ND. Entre estes dois horários, ou seja, em 120h, observou-se uma queda no conteúdo de eosinófilos nos LBA dos camundongos controles.

A administração do NaHS provocou uma redução na migração de eosinófilos para os pulmões de animais sensibilizados em 48h e 144h após o desafio com OVA, quando comparado com o respectivo grupo controle (Figura 1).

Nenhum efeito sobre o influxo de eosinófilos para o pulmão foi observado em resposta ao tratamento com NaHS em 120h após o desafio com OVA, quando comparado ao grupo controle (Figura 1).



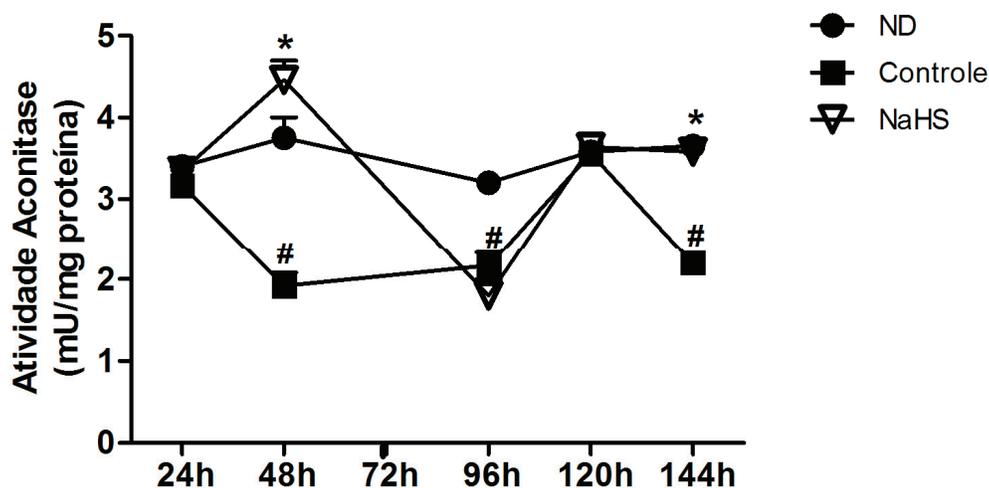
**Figura 1. Efeito do NaHS na migração de eosinófilos para os pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controles) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os LBA foram coletados dos animais em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio com OVA. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 8 animais. <sup>#</sup> $p < 0.05$  em relação ao grupo ND. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. <sup>+</sup> $p < 0.05$  em relação ao grupo controle em 24h.

#### **4.2 Avaliação da atividade da aconitase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA após tratamento com NaHS**

A aconitase é uma das enzimas do ciclo do ácido cítrico e é considerada como um importante marcador da ocorrência de estresse oxidativo, devido a sua sensibilidade ao ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Conforme mostrado na Figura 2, observou-se uma menor atividade da aconitase nos pulmões do grupo controle em 48h, 96h e 144h após o desafio, quando comparado ao grupo ND. Nenhuma modificação na atividade da aconitase foi detectada nos demais períodos estudados.

O tratamento com o NaHS recuperou a atividade da aconitase em 48h e 144h após o desafio com OVA, uma vez que os valores de atividade obtidos foram semelhantes aos observados no grupo ND (Figura 2).



**Figura 2. Efeito do tratamento com NaHS na atividade da aconitase nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controles) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a dosagem da atividade da aconitase 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 ND. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

### **4.3 Avaliação da atividade da fumarase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA após tratamento com NaHS**

Para confirmar se a diminuição na atividade da aconitase foi devido ao estresse oxidativo e não um efeito global nas enzimas do ciclo do ácido cítrico dosou-se também a atividade da fumarase nos pulmões dos camundongos dos diferentes grupos.

Conforme mostrado na Tabela 1, a atividade da fumarase não apresentou diferenças entre os grupos controle e ND. Do mesmo modo, nenhuma diferença foi observada entre o grupo controle e os animais tratados com NaHS em nenhum dos períodos estudados.

**Tabela 1- Atividade da fumarase nos pulmões de camundongos sensibilizados e não desafiados (ND) ou desafiados com OVA e não tratados (controle) ou tratados com NaHS em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o desafio antigênico.**

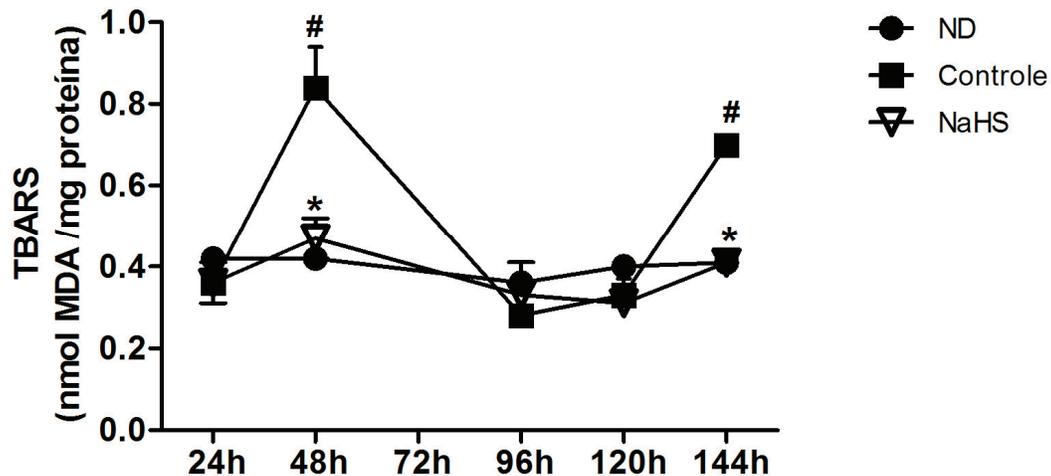
Grupos	Atividade Fumarase (U/mg proteína)				
	24h	48h	96h	120h	144h
ND	1.43 ± 0.12	1.43 ± 0.12	1.55 ± 0.08	1.52 ± 0.09	1.43 ± 0.00
Controle	1.66 ± 0.19	1.33 ± 0.08	1.40 ± 0.08	1.49 ± 0.08	1.43 ± 0.12
NaHS	1.66 ± 0.15	1.39 ± 0.05	1.38 ± 0.05	1.51 ± 0.07	1.41 ± 0.08

Os resultados representam a média ± E.P.M de 6 animais.

#### **4.4 Efeito do tratamento com NaHS na peroxidação lipídica nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

Como mostrado na Figura 3, os níveis de TBARS aumentaram nos pulmões do grupo controle em 48h e 144h, quando comparado ao grupo ND.

Nestes mesmos horários, o tratamento com NaHS produziu uma redução dos níveis de TBARS, quando comparado ao grupo controle (Figura 3). Nenhuma modificação nos níveis de TBARS foi observada nos demais períodos estudados.



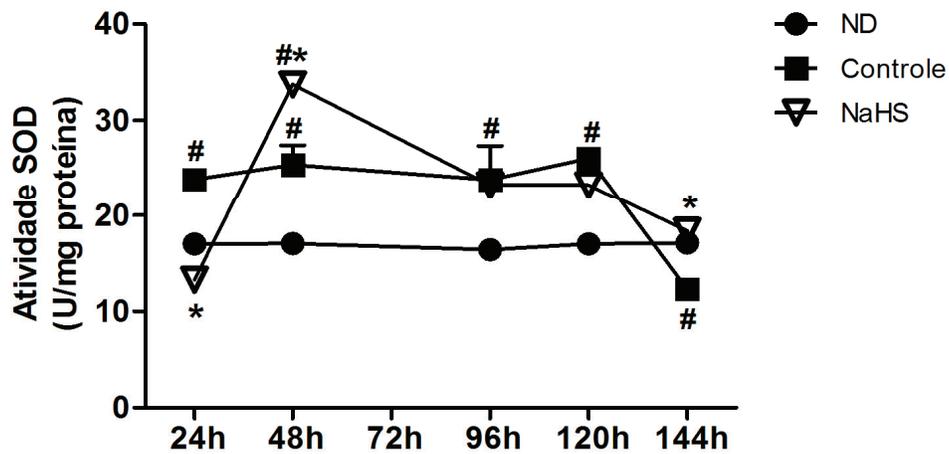
**Figura 3. Efeito do tratamento com NaHS na peroxidação lipídica nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controle) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a determinação de MDA pela técnica de TBARS 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 ND. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

#### **4.5 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da superóxido dismutase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na linha de defesa contra o estresse oxidativo. Esta enzima antioxidante protege as células contra os efeitos do  $O_2^{\bullet-}$ , catalisando a reação de dismutação que o converte em  $H_2O_2$ .

Conforme mostrado na Figura 4, um aumento da atividade da SOD foi observado nos pulmões do grupo controle em 24h, 48h, 96h e 120h após o desafio com OVA, quando comparado ao grupo ND. Por outro lado, a atividade da SOD se encontrava reduzida em 144h após o desafio nos pulmões do grupo controle.

O tratamento com NaHS manteve a atividade da SOD em 24h aos níveis semelhantes ao do grupo ND. Em contrapartida, em 48h e 144h ocorreram aumentos nas atividades desta enzima, quando comparado aos respectivos grupos controles (Figura 4). Nenhuma modificação na atividade da SOD foi produzida pelo tratamento com NaHS nos demais períodos estudados, comparados ao grupo controle.



**Figura 4. Efeito do tratamento com NaHS na atividade da SOD nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controle) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a dosagem da atividade da SOD 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 ND. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

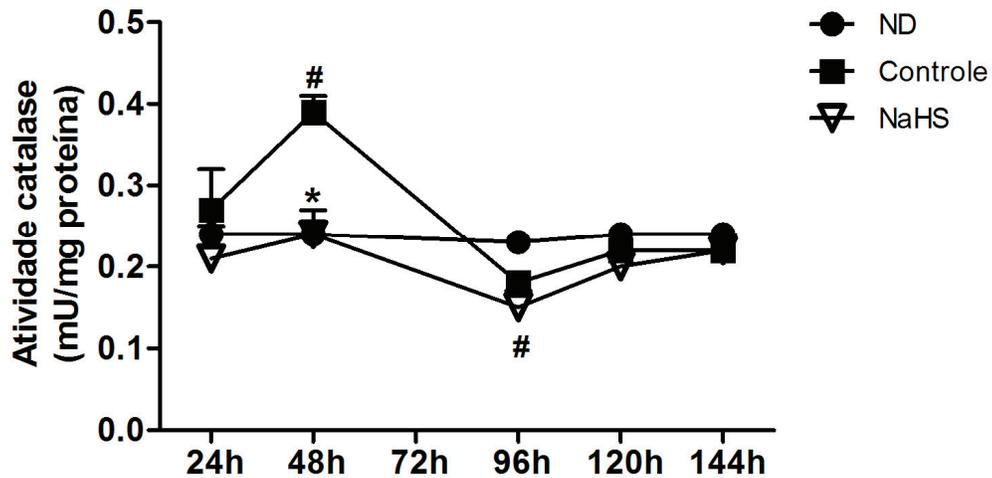
#### **4.6 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da catalase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

A catalase participa da degradação do  $H_2O_2$  produzido durante a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  pela SOD, convertendo-o em  $H_2O$  e  $O_2$ . Esta enzima antioxidante complementa a ação da SOD na neutralização dos radicais livres.

Conforme mostrado na Figura 5, a atividade da catalase aumentou nos pulmões do grupo controle em 48h após o desafio, quando comparado ao grupo ND.

Neste mesmo horário, o tratamento com NaHS manteve a atividade da catalase aos níveis semelhantes aos do grupo ND e, portanto, significativamente diminuídos em relação ao grupo controle (Figura 5).

Não foram observadas modificações na atividade da catalase nos demais horários estudados, quando comparado ao grupo controle.



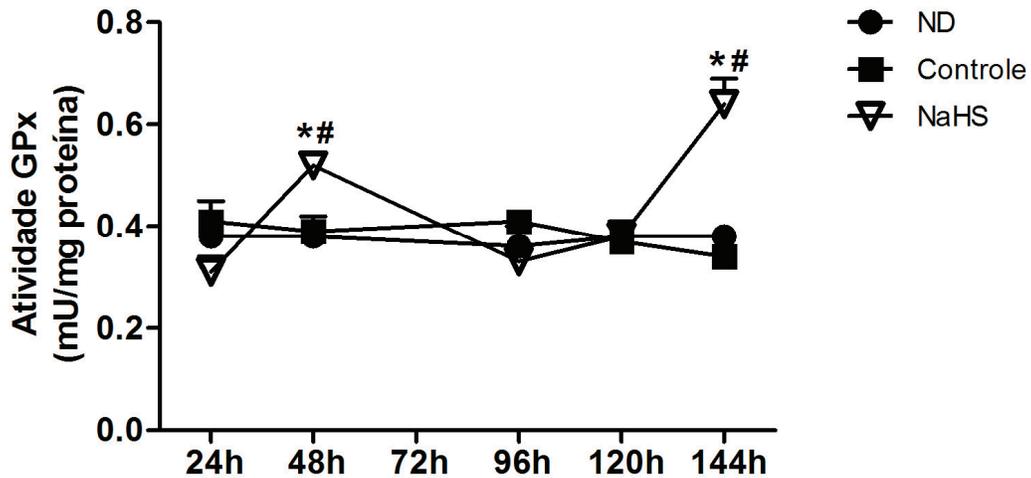
**Figura 5. Efeito do tratamento com NaHS na atividade da catalase nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controle) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a dosagem da atividade da catalase 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 ND. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

#### **4.7 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da glutathione peroxidase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

O ciclo da glutathione é um mecanismo importante de redução do  $H_2O_2$ . A enzima glutathione peroxidase (GPx), assim como a catalase, atuam na neutralização deste peróxido. Ao degradar o  $H_2O_2$ , a GPx utiliza a glutathione reduzida (GSH) e gera glutathione oxidada (GSSG), a qual sofre ação da glutathione reductase (GR), recuperando a glutathione reduzida (GSH) com concomitante consumo de NADPH.

Conforme mostrado na Figura 6, a análise da GPx nos pulmões do grupo controle demonstrou que sua atividade se apresentou constante em todos os horários analisados comparados com o grupo ND.

No entanto, o tratamento com NaHS aumentou a atividade da GPx em 48h e 144h após o desafio com OVA, comparado ao grupo controle (Figura 6).



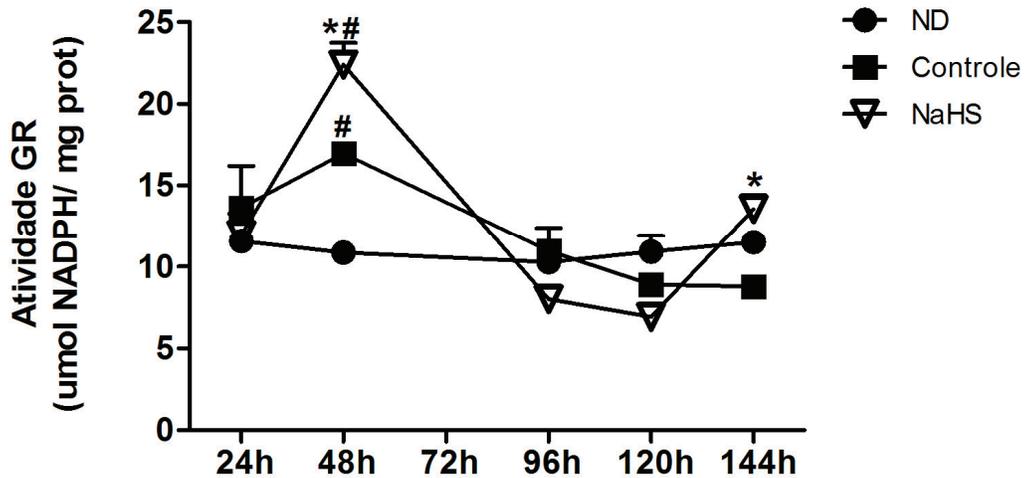
**Figura 6. Efeito do tratamento com NaHS na atividade da GPx nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controle) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a dosagem da atividade da GPx 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 ND. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

#### **4.8 Efeito do tratamento com NaHS na atividade da glutathiona redutase nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

Para verificar se o tratamento produz algum efeito sobre a enzima responsável pela manutenção dos níveis de GSH, foi avaliada a atividade da glutathiona redutase (GR) nos pulmões de animais sensibilizados e desafiados com OVA, tratados ou não com NaHS.

Conforme Figura 7, a atividade da GR aumentou nos pulmões do grupo controle em 48h após o desafio com OVA, quando comparado ao grupo ND.

O tratamento com NaHS aumentou a atividade desta enzima em 48h e 144h após o desafio com OVA, quando comparado ao grupo controle (Figura 7).



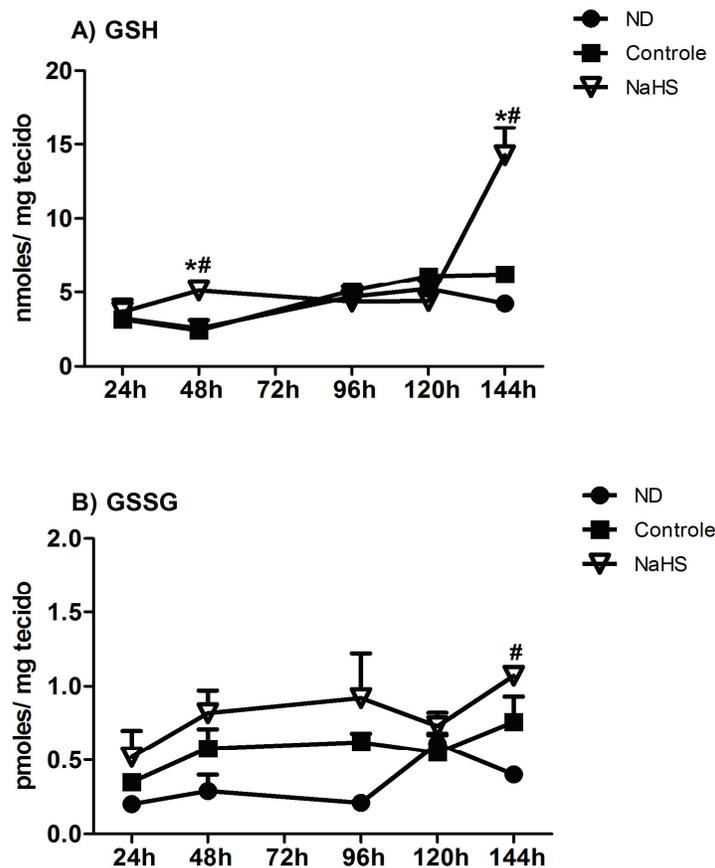
**Figura 7. Efeito do tratamento com NaHS na atividade da GR nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controle) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a dosagem da atividade da GR 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 ND. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

#### **4.9 Efeito do tratamento com NaHS nos níveis da glutathiona reduzida e glutathiona oxidada nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA**

Para verificar se o tratamento com o NaHS produz algum efeito nos níveis da glutathiona no tecido pulmonar, as concentrações da glutathiona na forma reduzida (GSH) e na forma oxidada (GSSG) foram determinadas nos animais alérgicos, tratados ou não com NaHS.

Conforme Figura 8, o desafio com OVA não provocou qualquer alteração nos níveis de GSH dos camundongos controles em qualquer período estudado, em comparação com os ND (Figura 8 A). No entanto, o tratamento com o NaHS foi capaz de aumentar os níveis de GSH em 48h e 144h após o desafio com OVA (Figura 8 A). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os grupos nos demais períodos estudados.

O desafio com OVA ou o tratamento com NaHS não produziu qualquer efeito nos níveis de GSSG pulmonar em nenhum dos períodos estudados (Figura 8 B).



**Figura 8. Efeito do tratamento com NaHS na concentração de GSH e GSSG nos pulmões de camundongos.** Os camundongos sensibilizados com OVA receberam ou não (controle) tratamento com NaHS antes dos desafios com OVA. Os animais não desafiados (ND) receberam somente salina estéril intranasal na ocasião do desafio. Os camundongos foram sacrificados em 24h, 48h, 96h, 120h e 144h após o primeiro desafio e os pulmões foram removidos para a determinação dos níveis de GSH (A) e GSSG (B) conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam a média  $\pm$  E.P.M de 3 animais. <sup>#</sup> $p < 0.05$  em relação ao grupo ND. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

## 5. Discussão

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada pela presença de infiltrado pulmonar rico em células inflamatórias, principalmente eosinófilos, resultando em broncoconstrição e remodelamento tecidual. O estresse oxidativo tem um importante papel em sua fisiopatologia devido à produção excessiva de ERO, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ; revisto por Hamid e Tulic, 2009). Estudos recentes demonstram que o  $H_2S$  pode ser um antioxidante, mas sua contribuição para a patofisiologia de doenças alérgicas pulmonares ainda não está estabelecida. Neste trabalho investigamos se o  $H_2S$  pode mediar o estresse oxidativo na inflamação alérgica pulmonar de camundongos.

Inicialmente, verificamos a cinética da migração dos eosinófilos para os pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (controle). Os resultados mostraram que o influxo de eosinófilos para os pulmões ocorreu entre 48h e 96h e, posteriormente, em 144h após o desafio antigênico. O aumento celular em 48h-96h neste modelo experimental corrobora com resultados anteriores de estudo feitos em nosso laboratório (Pelaquini et al., 2011), mas é a primeira vez que os estudos foram estendidos até o tempo de 144h após o desafio.

O tratamento dos animais com o doador de  $H_2S$ , o NaHS, preveniu o infiltrado de eosinófilos para os pulmões em 48h e 144h após o desafio com OVA. Levando-se em conta a correlação existente entre a presença de eosinófilos nos pulmões e o desenvolvimento da asma em modelo experimental e humano (revisto por Holgate, 2008), podemos considerar que o NaHS, ao inibir a migração

de eosinófilos, exerceu um efeito benéfico na inflamação alérgica pulmonar. Resultados semelhantes utilizando doadores de H<sub>2</sub>S foram obtidos por Chen et al. (2009) em ratos alérgicos e por Esechie et al. (2008) em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por inalação de fumaça em camundongos, onde o tratamento com o NaHS inibiu a migração de eosinófilos e neutrófilos para os pulmões. Anteriormente, Zanardo et al. (2006) descreveram uma redução do edema de pata e da infiltração de leucócitos na presença de NaHS, já indicando um efeito anti-inflamatório do H<sub>2</sub>S.

A asma é uma doença multifatorial e o estresse oxidativo é apontado como participante relevante em sua patogênese. O influxo anormal de células inflamatórias para as vias aéreas é associado com formação aumentada de ERO. Estas células podem produzir O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, via dependente do complexo NADPH da membrana e a subsequente dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, produz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambas as espécies são oxidantes moderados, mas sua interação com a peroxidase dos eosinófilos (EPO) pode catalisar uma reação que produz o potente oxidante •OH (revisado por Dworski, 2000). A relação entre níveis aumentados de ERO (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e •OH) pela ativação de células inflamatórias, como eosinófilos e neutrófilos nas vias áreas, foi observada em animais sensibilizados e desafiados com OVA em diferentes pesquisas (Barnes. 1990; Inagaki. 1993; Rahman et al., 1996; Lee et al., 2004). O aumento de radicais livres pode ter muitos efeitos na função respiratória, incluindo contração da musculatura lisa e hipersecreção de muco (revisado por Dworski, 2000).

O estresse oxidativo pode ser avaliado pela dosagem de enzimas antioxidantes ou, indiretamente, pela análise dos seus marcadores, como a

aconitase (Gardner et al., 1994) e o TBARS (Liu et al., 2009). No presente trabalho analisamos, primeiramente, a atividade da enzima aconitase como marcador indireto da produção do  $O_2^{\bullet-}$  intracelular, desde que existe uma relação inversa entre a atividade desta enzima e os níveis do  $O_2^{\bullet-}$  (Gardner et al., 1994; Evelson et al., 2000). Verificamos que o desafio antigênico no grupo controle reduziu a atividade da aconitase em 48h, 96h e 144h após o desafio com OVA, coincidindo com os mesmos horários em que se observaram os maiores picos de migração dos eosinófilos para os pulmões dos animais controles. Estes resultados sugerem que a migração dos eosinófilos em resposta ao desafio antigênico aumentou a produção do  $O_2^{\bullet-}$  nos pulmões destes animais, inativando a enzima aconitase. Estudo de Evelson et al. (2000) utilizando modelo de hiperoxia em ratos mostraram que o excesso de oxigênio resultou em lesão pulmonar acompanhada de aumento da migração de leucócitos e da produção de  $O_2^{\bullet-}$  e, concomitantemente, redução da atividade da aconitase, indicando lesão oxidativa nos pulmões destes animais.

O tratamento dos camundongos alérgicos com o NaHS foi capaz de recuperar a atividade da aconitase em níveis similares ao grupo ND e, conseqüentemente, sugere que houve redução nos níveis de  $O_2^{\bullet-}$  em 48h e 144h após o desafio com OVA, mostrando, então, o envolvimento do  $H_2S$  no processo. A atividade da fumarase foi constante em todos os grupos experimentais, indicando efeito específico e não global do estresse oxidativo nas proteínas, conforme descrito por Gurgueira et al. (2002).

A peroxidação lipídica é também outro importante marcador do estresse oxidativo, cuja reação é desencadeada pelo excesso de radicais livres,

principalmente pelo radical  $\bullet\text{OH}$ , que provoca a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Verificamos que a peroxidação lipídica aumentou no pulmão dos camundongos do grupo controle em 48h e 144h após o desafio antigênico. Estes resultados sugerem que na inflamação alérgica pulmonar com aumento de eosinófilos pode provocar aumento da produção de radicais livres, como o radical  $\bullet\text{OH}$ , resultando na peroxidação lipídica. O tratamento dos animais alérgicos com o NaHS produziu uma redução da peroxidação lipídica em 48h e 144h após o desafio antigênico.

Levando-se em conta que o  $\text{H}_2\text{S}$  é uma molécula altamente reativa podendo reagir especialmente com ERO (revisto por Lowicka e Beltowsky, 2007), estes resultados sugerem que o tratamento com o doador de  $\text{H}_2\text{S}$  pode diretamente se ligar e retirar o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e os radicais  $\bullet\text{OH}$  formados ou interferir com a modulação de enzimas antioxidantes. No entanto, como a diminuição dos níveis de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e da peroxidação lipídica como do infiltrado de eosinófilos no pulmão ocorreram nos mesmos horários, não podemos descartar uma correlação entre estes resultados, ou seja, o envolvimento dos eosinófilos na produção das ERO, como descrito por Abe et al. (2006).

As enzimas antioxidantes estão presentes nas vias aéreas para proteger as células da toxicidade das ERO. Um excesso de ERO ou mecanismos de defesa antioxidantes endógenos defeituosos podem estar presentes na asma (Comhair et al., 2002). Verificamos em nossa pesquisa um aumento da atividade da SOD nos pulmões do grupo controle de 24h a 120h. Evelson et al. (2000) e Abe et al. (2006), utilizando modelo experimental de hiperóxia induzida por oxigênio e de asma, respectivamente, sugerem que o aumento da atividade e da expressão da

SOD pulmonar observado nestes animais pode ser uma resposta adaptativa das vias aéreas na tentativa de neutralizar o  $O_2^{\bullet-}$ . Por outro lado, nossos resultados mostraram em 144h uma redução da atividade da SOD. Comhair et al. (2000), descreveram que a capacidade antioxidante do trato respiratório está diminuída na asma devido à redução da atividade da SOD nas células epiteliais brônquicas. Uma das causas desta redução da SOD na asma é devida ao excesso de  $O_2^{\bullet-}$  nos pulmões inativando esta enzima (Heininger et al., 2005). Miguel et al. (2009) demonstraram que o estresse oxidativo crônico induzido por  $H_2O_2$  é capaz de diminuir a atividade das principais enzimas antioxidantes, inclusive a SOD. Em nosso modelo, a redução da atividade da SOD foi observada somente na fase mais tardia em 144h após o desafio antigênico.

O sistema glutaciona redox, composto principalmente pelas enzimas GPx e GR, é um importante ciclo responsável pela manutenção dos níveis de GSH e da atividade antioxidante da GPx. Sob a ação de radicais livres, o GSH é oxidado para a forma glutaciona oxidada (GSSG), em uma reação catalisada pela enzima GPx (revisto por Comhair e Erzurum, 2010).

No presente estudo, observamos que a atividade pulmonar da enzima GPx não sofreu qualquer alteração no grupo controle em nenhum dos horários estudados, enquanto a atividade da GR aumentou somente em 48h após o desafio antigênico neste grupo. Do mesmo modo, os níveis de GSH e GSSG não sofreram qualquer alteração no grupo controle. Estudos de Comhair et al. (2000 e 2002) indicaram ausência de alteração da atividade da GPx, aumento dos níveis de GSSG e redução de GSH no LBA de pacientes asmáticos. No entanto,

nenhumas destas mudanças foram verificadas em nossos animais alérgicos, provavelmente, por diferenças de espécies estudadas.

No entanto, o tratamento dos camundongos alérgicos com NaHS modulou a atividade das enzimas antioxidantes nos pulmões. Ou seja, a atividade da SOD, assim como da GPx e GR e os níveis de GSH estavam aumentadas em 48h e 144h após o desafio antigênico neste grupo de camundongos. Estes últimos resultados (GPx, GR e GSH) indicam um importante efeito do H<sub>2</sub>S na modulação do ciclo da glutathiona. Os níveis de GSSG não foram alterados pelo tratamento com o NaHS. Estes resultados estão de acordo com os observados por Kimura et al. (2004) onde o tratamento com o NaHS aumentou os níveis de GSH nos neurônios de ratos submetidos ao estresse oxidativo pelo glutamato e não afetou os níveis de GSSG, desempenhando papel protetor no sistema nervoso.

Levando-se em conta as reações catalisadas por cada uma destas enzimas, estes resultados sugerem redução do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (devido ao aumento da SOD, GPx e aconitase) que poderia limitar a produção de <sup>•</sup>OH pela viabilidade do substrato, reduzindo a peroxidação lipídica como observado neste estudo. Além disto, observou-se ampliação da atividade da enzima GR e consequente aumento da GSH pelo tratamento com NaHS, sugerindo um efeito promissor do tratamento com doadores de H<sub>2</sub>S na manutenção dos níveis de GSH, bem como das enzimas que participam de seu metabolismo.

Estes resultados estão de acordo com os observados por Liu et al. (2009) que demonstraram que o tratamento com NaHS protegeu a injúria intestinal em modelo de ratos submetidos à isquemia de reperfusão. Conforme os autores, este efeito benéfico foi mediado pelo aumento da atividade das enzimas SOD e GPx ao

reduzir o estresse oxidativo. Do mesmo modo, em modelo *in vitro* utilizando células endoteliais submetidas ao estresse oxidativo induzido por metionina, verificou-se que a administração do H<sub>2</sub>S protegeu as células do estresse oxidativo também pelo aumento da atividade da SOD, da catalase e dos níveis de GSH (Tyagi et al., 2009).

Por outro lado, em nosso estudo, a atividade da catalase aumentou nos pulmões do grupo controle em 48h após o desafio antigênico. O tratamento com o NaHS reduziu a atividade da catalase para os mesmos níveis do grupo ND, que pode ser decorrente de uma adaptação do sistema enzimático pelos baixos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultado do aumento da atividade da GPx em 48h. Considerando a diferença entre os valores de Km (constante de Michaelis Menten) das enzimas para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a enzima GPx possui uma maior afinidade para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a catalase, conforme descrito por Jones e Suggette. (1968). Além disso, a GPx está presente em todos os ambientes celulares como mitocôndrias e, portanto, é considerada mais importante na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a catalase (Li et al., 2000).

## 6. Conclusões

Baseado nos resultados, mostrados neste estudo, podemos concluir que a administração do doador de H<sub>2</sub>S produziu efeito benéfico na inflamação alérgica pulmonar, que inclui a inibição do recrutamento de eosinófilos para o pulmão, redução dos níveis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e da peroxidação lipídica e aumento das defesas enzimáticas antioxidantes endógenas e GSH.

Deste modo, o NaHS (e, provavelmente, outros doadores de H<sub>2</sub>S) pode apresentar um importante potencial de uso terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonar caracterizada pelo desbalanceamento do equilíbrio oxidante/antioxidante.

## 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: 1083-1095.

Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JM. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J.* 1989; 258: 617-620.

Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9: 235-243.

Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3546-3556.

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.

Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 1987; 63: 152-157.

Carlberg I, Mannervick V. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 1975; 250: 5475-5480.

Chen Y, Wang R. The message in the air: Hydrogen sulfide metabolism in chronic respiratory diseases. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012.

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 chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2005; 28: 694-697.

Comhair SA, Bhathena 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. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283: 246-255.

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

De Raeve HR, Thunnissen FB, Kaneko FT, Guo FH, Lewis M, Kavuru MS et al. Decreased Cu, Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1997; 272: 148-154.

Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax*. 2000; 55: 51-53.

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: 91-97.

Evelson P, Gonzalez FB. Time course and quantitative analysis of the adaptive responses to 85% oxygen in the rat lung and heart. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1523: 209-216.

Feder LS, Stelts D, Chapman RW, Manfra D, Crawley Y, Jones H et al. 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 et al. 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.

Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology.* 1998; 201: 1203–1209.

Furne J, Springfield J, Koenig T, Demaster E, Levitt M. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62: 255-259.

Gardner PR, Nguyen DD, White CW. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 12248-12252.

Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, González FB. Rapid Increases in the Steady-State Concentration of Reactive Oxygen Species in the Lungs and Heart after Particulate Air Pollution Inhalation. *Environ Health Perspect.* 2002;110: 749-755.

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: 891-902.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57: 715–725.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1-14.

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

Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 193-204.

Heininger JY, Ckless K, Reynaert N, van der Vliet A. SOD Inactivation in Asthma Bad News or NO News?. *American Journal of Pathology.* 2005; 166: 649-652.

Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P et al. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 709-750.

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 872-897.

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; 163:1233-1240.

Inagaki M. An increase in superoxide generation of bronchoalveolar lavage fluids in the model of late asthmatic response in guinea pigs. *J Asthma*. 1993; 30: 401-405.

Jones P, Suggett A. The Catalase-Hydrogen Peroxide System. Kinetics of catalytic action at high substrate concentrations. *Biochem J*. 1968; 110: 617-620.

Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*. 2004; 18: 1165-1167.

Koarai A, Ichinose M, Sugiura H, Tomaki M, Watanabe M, Yamagata S et al. iNOS depletion completely diminishes reactive nitrogen-species formation after an allergic response. *Eur Respir J*. 2002; 20: 609–616.

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

Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111: 450-463.

Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.

Lee YC, Lee KS, Park SJ, Park HS, Lim JS, Park KH et al. 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.

Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, Demaster E. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1107-1114.

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J.* 2005; 19: 1196-1198.

Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 2000; 60: 3927–3939.

Li T, Zhao B, Wang C, Wang H, Liu Z, Li W et al. 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: 1081-1087.

Liu H, Bai XB, Shi S, Cao YX. Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia–reperfusion injury in rats. *JPP.* 2009; 61: 207-212.

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

Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev.* 2008; 226: 112-131.

Masoli M, Fabian D, Holt S et al. Global Initiative for Asthma (GINA) program: the global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004; 59: 469-478.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244: 6049–6055.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem.* 1983; 52: 711–760.

Meister A. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *J Nutrit Sci Vitaminol.* 1992. 1–6.

Meneghini R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mutation Research.* 1988; 195: 215-230.

Miguel F, Augusto AC, Gurgueira SA. Effect of acute vs chronic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. *Free Radic Res.* 2009; 43: 40-47.

Nelson D, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem.* 1972; 49: 474–478.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358.

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 oxidemodulated eosinophilmigration from bone marrow to lungs in allergic mice. *International Immunopharmacology.* 2011; 11: 204–211.

Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Gluathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 3071-3076.

Racker E. Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. *Biochim Biophys Acta.* 1950; 4: 211–214.

Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 1055-1060.

Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman TB, Kamp WD, Athar M. Glutathione Redox System in Oxidative Lung Injury. *Critical Reviews in Toxicology*. 1999; 29: 543–568.

Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol*. 2006; 533: 240-252.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004; 84: 731-765.

Salahudeen AK. Free Radicals in Kidney Disease and Transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 1999; 10: 137-143.

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: 640-646.

Searcy DG. HS-: O<sub>2</sub> oxidoreductase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 334: 50-58.

Smith LJ, Houston M, Andreson J. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147: 1461-1464.

Su YW, Liang C, Jin HF, Tang XY, Han W, Chai LJ et al. Hydrogen Sulfide Regulates Cardiac Function and Structure in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy. *Circ J.* 2009; 73: 741-749.

Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ.* 2009; 181: 181-190.

Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 917-935.

Tyagi N, Moshal KS, Sen U, Vacek TP, Kumar M, Hughes WMJr et al. H<sub>2</sub>S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11: 25-33.

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: 1792-1798.

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: 303-310.

Woods AS, Miles SJ, Roberts ER, Guest RJ. Structural and functional relationships between fumarase and aspartase. Nucleotide sequences of the fumarase (fumC)

and aspartase (aspA) genes of Escherichia coli K12. *Biochem J.* 1986; 237: 547-557.

Yilmaz O, Keser S, Tuzcu M, Guvenc M, Cetintas B, Irtegun S et al. A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2009; 8: 343-347.

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: 2118-2120.

Zhao Y, Seefeldt T, Chen W, Wang X, Matthees D, Hu Y, Guan X. Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems. *Arch Biochem Biophys.* 2009; 485: 56-62.





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

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036