

**LUIS GUSTAVO DE SOUZA FILHO**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA  
DE INIBIDORES DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES  
NA INFILTRAÇÃO DE EOSINÓFILOS PARA AS VIAS  
AÉREAS DE CAMUNDONGOS ALÉRGICOS**

**CAMPINAS**

**UNICAMP**

**2008**

**LUIS GUSTAVO DE SOUZA FILHO**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA  
DE INIBIDORES DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES  
NA INFILTRAÇÃO DE EOSINÓFILOS PARA AS VIAS  
AÉREAS DE CAMUNDONGOS ALÉRGICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Campinas**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So89e Souza Filho, Luis Gustavo  
Efeito da administração aguda e crônica de inibidores das óxido nítrico sintases na infiltração de eosinófilos para as vias aéreas de camundongos alérgicos / Luis Gustavo Souza Filho. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Edson Antunes  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Eosinófilos. 2. Óxido Nítrico. 3. L-NAME. 4. Biodisponibilidade. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Effect of acute and chronic administration of nitric oxide synthase inhibitors on the eosinophil infiltration into the always of allergic mice**

**Keywords:** • Eosinophil  
• Nitric Oxide Synthase  
• L-NAME  
• Bioavailability

**Titulação: Mestre em Farmacologia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Edson Antunes  
Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa  
Profa. Dra. Sisi Marcondes**

**Data da defesa: 06 - 08 - 2008**



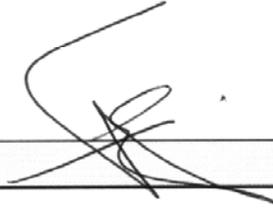
---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

Prof. Dr. Edson Antunes

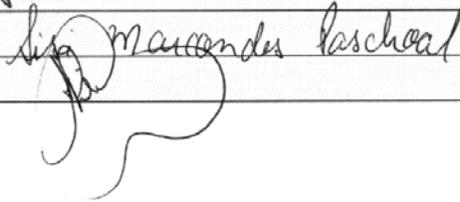
A handwritten signature in black ink, appearing to be "E. Antunes", written over a horizontal line.

**Membros:**

Prof. Dr. Edson Antunes

Profa. Dra. Sisi Marcondes Paschoal

Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

A handwritten signature in black ink, appearing to be "E. Antunes", written over a horizontal line.A handwritten signature in black ink, appearing to be "Sisi Marcondes Paschoal", written over a horizontal line.

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

---

**Data: 06/08/2008**

---

## **DEDICATÓRIA**

*À Deus, pela dádiva eterna da vida cumulada a mim.*

*Aos meus pais Sr. Luis José e Sra. Beatriz,  
que pelo amor incondicional e pelo carinho  
absoluto aquietam minh'alma.*

*A minha querida avó Sra. Raymunda, que tornou paupáveis  
as fábulas que ouvi quando criança sobre “as vovós que a beira de  
um fogão a lenha fazia doces e quitandas, e  
sentada numa cadeira confortável cosia e contava histórias”.*

*Aos meus irmãos Bruno, Flávia, Graziela, Lorena e  
Vanuza pela compreensão, pela dedicação e pela doação que  
nunca deixaram que o irmão pouco sensível se esmorecesse.*

*Aos meus filhos que tornaram possível a mim tocar o infinito.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pelo ensejo do aprendizado técnico-ciêntífico, pela orientação e pela amizade;

Ao Prof. Stephen Hyslop e família pela amizade e apoio;

Aos Professores Elen Landucci, saudoso Cleber Teixeira , Sisi Marcondes, Heitor Moreno e Gilberto De Nucci;

Aos funcionários e amigos do departamento de farmacologia da UNICAMP Wanderlei, Francileuda, Elaine, Aguinaldo, Adilson, José Ilton, Toninho e Cristiane (CEMIB) pela solicitude e presteza, e aos fantásticos Sr. Miguel e Marcos pelo zelo e atenção dispensados ao lidar com os animais;

As extraordinárias amigas do “Edema” Ivani de Souza, Tatiane Ferreira, Nádia Mariano, Gláucia Coelho de Mello, Giovana, Adriana Rampazio, Camila, Marina e Mônica pelo companheirismo e carinho, além do grande amigo Fábio Marangoni;

Aos amigos da “Casca” Mário Ângelo, Maria Andréia, Camila de Moraes, Fernando Bau, Fabíola Mônica, Fernanda Priviero, Haroldo Flores, Juliana Baracat, Rafael Annovazi, Júlio e Rodrigo com os quais aprendi e diverti desde o início da minha jornada no laboratório;

Aos amigos da “Célula” Rafael Prada, Lineu Baudissera, Priscila Monteiro, Luciana que proporcionaram refrigério nesta minha caminhada;

À tutora e amiga Letícia pela preciosa ajuda nos experimentos e auxílio na compreensão do processo inflamatório;

Aos Professores Marcelo Muscará e Simone teixeira pela colaboração com a dosagem de atividade da NOS;

Aos Professores Sônia Jancar e Richardt Landgraf pela colaboração com as análises morfológicas;

Aos Professores Gilberto De Nucci e Gustavo Mendes pela colaboração com a dosagem sorológica do L-NAME e seu metabólito;

Aos amigos que já passaram pelo laboratório: Enilton Aparecido Camargo, Marcelo Datti, Fernanda Datti, Paula Rubya, Carla Penteado, Márcia Cardoso e Juliana Moreira saibam que as saudades são muitas;

Aos amigos “cascateiros”: Fernando Bau, Rafael Annovazzi, Maria Andréia Delbin, Camila de Moraes, Juliana Baracat, Mario Claudino, Fernanda Priviero, Haroldo Flores, Fabíola Mônica;

Aos demais amigos da UNICAMP: Delano, Elionai, Raquel, Renata, Thomaz, Daniel, Lourdes, Maricene, Marcelo, Érika, Adriana, Mariana, Letícia Bignotto (para sempre serei grato), Thiago, Sandro, Wendel e Rossano;

Aos caros amigos “BOLEIROS” Caboclo, Manel, Paíinho, Tim, Pingado, Gaúcho e Couve-flor;

*O valor de todo o conhecimento está no seu vínculo  
com as nossas necessidades, aspirações e ações;  
de outra forma, o conhecimento torna-se um simples  
lastro de memória, capaz apenas - como um navio que  
navega com demasiado peso - de diminuir a  
oscilação da vida quotidiana*

**Vassili Kliutchevski**

---

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xviii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxi</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>1.1- Asma</b> .....	25
<b>1.2- Eosinófilos e asma</b> .....	26
<b>1.3- Modelos de asma experimental</b> .....	29
<b>1.4- Óxido Nítrico (NO)</b> .....	30
1.4.1- Óxido nítrico e asma.....	32
<b>1.5- Objetivos</b> .....	34
1.5.1- Objetivos específicos.....	34
<b>2- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>2.1- Animais</b> .....	36
<b>2.2- Tratamentos com L-NAME e aminoguanidina</b> .....	36
<b>2.3- Sensibilização e desafio intranasal com OVA</b> .....	36
<b>2.4- Coleta e contagem de células do sangue periférico, do lavado broncoalveolar e da medula óssea</b> .....	37
2.4.1- Sangue periférico.....	37
2.4.2- Lavado broncoalveolar (LBA).....	37
2.4.3- Medula óssea.....	38
<b>2.5- Análise histológica</b> .....	38
<b>2.6- Dosagem de NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>-)</b> .....	38

<b>2.7- Dosagem sérica de IgE.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8- Dosagem de IL-5.....</b>	<b>39</b>
<b>2.9- Dosagem de eotaxina.....</b>	<b>39</b>
<b>2.10- Dosagem da atividade das óxido nítrico sintases (NOS).....</b>	<b>39</b>
<b>2.11- Metodologia analítica para a quantificação de L-NAME e N<math>\omega</math>-nitro-L-arginina no soro.....</b>	<b>41</b>
<b>2.12- Análise dos Resultados.....</b>	<b>45</b>
<b>3- RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1- Efeito dos tratamentos crônicos e agudo com L-NAME e/ou aminoguanidina sobre o número de eosinófilos.....</b>	<b>47</b>
3.1.1- LBA.....	47
3.1.2- Histologia pulmonar.....	50
3.1.3- Sangue periférico e medula óssea.....	51
<b>3.2- Medida da atividade da NOS nos animais tratados com L-NAME (agudo e crônico) ou aminoguanidina.....</b>	<b>56</b>
3.2.1- Atividade da NOS cerebral.....	56
3.2.2- Medida da atividade das óxido nítrico sintases no pulmão.....	58
<b>3.3- Níveis de metabólitos do NO no LBA.....</b>	<b>59</b>
<b>3.4- Níveis séricos de IgE e eotaxina no lavado broncoalveolar.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5- Estudo farmacocinético: Determinação do L-NAME e N<math>\omega</math>-nitro-L-arginina no soro.....</b>	<b>63</b>
<b>4- DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>BH<sub>4</sub></b>	tetraidrobiopterina
<b>BSA</b>	albumina bovina sérica
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	cloreto de cálcio diidratado
<b>cGMP</b>	monofosfato de guanosina cíclico
<b>cNOS</b>	óxido nítrico sintase constitutiva
<b>D-arg</b>	D-arginina
<b>ECP</b>	proteína catiônica do eosinófilo
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminatetracético
<b>EGTA</b>	ácido etilenoglicol-bis-(β-éter aminoetil) N,N,N',N'-tetracético
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintase endotelial
<b>EOS</b>	eosinófilos
<b>EPM</b>	erro padrão da média
<b>EPO</b>	peroxidase eosinofílica
<b>FAD</b>	flavina adenina dinucleotídeo
<b>FMN</b>	flavina mononucleotídeo
<b>GM-CSF</b>	fator estimulante de colônia granulócito-macrófago
<b>H/E</b>	hematoxilina/eosina
<b>HEPES</b>	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
<b>ICAM-1</b>	intercellular adhesion molecule-1
<b>IgE</b>	imunoglobulina E
<b>IL</b>	interleucina
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintase induzível

<b>INF-<math>\gamma</math></b>	interferon-gama
<b>LBA</b>	lavado broncoalveolar
<b>L-NAME</b>	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>L-NMMA</b>	N <sup>o</sup> -monometil-L-arginina
<b>L-NNA</b>	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>Mac-1</b>	macrophage-1 antigen
<b>MAdCAM-1</b>	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
<b>MBP</b>	proteína básica principal
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	proteína inibitória do macrófago
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina difosfato
<b>NHA</b>	N <sup>o</sup> -hidroxi-L-arginina
<b>NDE</b>	neurotoxina derivada do eosinófilo
<b>nNOS</b>	óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitrato
<b>NO-Hb</b>	nitrosil hemoglobina
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintases
<b>NO<sub>x</sub></b>	metabólitos do óxido nítrico
<b>OPD</b>	dicloridrato de ortofenilenodiamina
<b>OVA</b>	ovalbumina
<b>PBF</b>	tampão formalina-fosfato
<b>PBS</b>	tampão salina-fosfato

<b>PMSF</b>	fluoreto de fenilmetilsulfonila
<b>PSGL-1</b>	P-selectin glycoprotein ligand-1
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SC-51</b>	L-N <sup>6</sup> -(1-iminoetil)-lisina-5-tetrazoleamida
<b>Th<sub>2</sub></b>	linhagem celular
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral-alfa
<b>VCAM-1</b>	vascular cell adhesion molecule-1
<b>VLA-4</b>	very late antigen-4
<b>1400W</b>	N-(3-amonometil) benzil) acetamidina

## LISTA DE MATERIAIS

---

<b><u>Susbtância</u></b>	<b><u>Procedência</u></b>
<b>Ácido acético glacial</b>	J.T.Baker (Eldorado, México)
<b>Ácido cítrico</b>	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
<b>Ácido fórmico</b>	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<b>Álcool (70% - 100%)</b>	Merck (Darmstadt, Alemanha)
<b>Al(OH)<sub>3</sub></b>	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Aminoguanidina</b>	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<b>BSA</b>	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	Merck (Darmstadt, Alemanha)
<b>Cloral hidratado</b>	Reagen (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Corante hematológico</b>	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
<b>Cristal de violeta</b>	Merck (Darmstadt, Alemanha)
<b>D-arginina</b>	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<b>EDTA</b>	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
<b>EGTA</b>	Amersham Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra)
<b>Formaldeído (37%)</b>	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
<b>Fosfato de potássio</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Fucsina básica</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>FORANE<sup>®</sup></b>	ABBOTT (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>HCl</b>	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
<b>H/E</b>	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
<b>HEPES</b>	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
<b>[H<sup>3</sup>]-L-arginina</b>	Amersham Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>KCl</b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
<b>Kit colorimétrico NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Cayman <sup>™</sup> (Ann Arbor, EUA)
<b>Kit colorimétrico proteico</b>	Bio Rad <sup>™</sup> (Hercules, EUA)

**Susbtância****Kit mouse Eotaxina****Kit mouse IgE****Kit mouse IL-5****L-citulina****L-NAME****L-NNA****LPS****Metanol****Metabissulfito de sódio****NaCl****Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>****NADPH****NaHCO<sub>3</sub>****Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>****NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O****Óleo de imersão p/ microscopia****OPD****OVA (grau V)****PMSF****Resina de troca iônica****(Dowex AG 50X-8)****Solução fisiológica 0,9%****Tris****Tween 20****Xilol****Procedência**

R&amp;D Systems™ (Minneapolis, EUA)

Bethyl™ (Montgomery, EUA)

R&amp;D Systems™ (Minneapolis, EUA)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Nuclear (Diadema, Brasil)

Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Merck (Darmstadt, Alemanha)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

EQUIPLEX® (Aparecida de Goiânia, Brasil)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Labsynth (Diadema, Brasil)

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Resultado das contagens de leucócitos no lavado broncoalveolar....	49
<b>Tabela 2-</b> Resultado das contagens de leucócitos no sangue.....	54
<b>Tabela 3-</b> Resultado das contagens de leucócitos na medula.....	55
<b>Tabela 4-</b> Resultado das análises em cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa para a determinação do L-NAME e N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina no soro.....	63

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Efeito dos tratamentos crônicos com L NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) e do tratamento agudo com L NAME (50 mg/kg) sobre o número de eosinófilos do lavado broncoalveolar.....	48
<b>Figura 2-</b> Efeito do tratamento crônico com L NAME (150 mg/kg/dia) sobre os eosinófilos do parênquima pulmonar.....	50
<b>Figura 3-</b> Efeito do tratamento crônico com L NAME (150 mg/kg/dia), 48 h após a indução da inflamação alérgica das vias aéreas, sobre o infiltrado eosinófilico no pulmão.....	51
<b>Figura 4-</b> Efeito dos tratamentos crônicos com L NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) e do tratamento agudo com L NAME (50 mg/kg) sobre o número de eosinófilos do sangue periférico (painel A) e da medula óssea (painel B).....	53
<b>Figura 5-</b> Efeito dos tratamentos crônicos com L NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) e do tratamento agudo com L NAME (50 mg/kg) sobre a atividade da nNOS no homogenato cerebral.....	57
<b>Figura 6-</b> Efeito dos tratamentos crônicos com L NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) e do tratamento agudo com L NAME (50 mg/kg) sobre a atividade da iNOS no homogenato pulmonar.....	59

<b>Figura 7-</b> Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) e do tratamento agudo com L-NAME (50 mg/kg) sobre os níveis de NO <sub>x</sub> no lavado broncoalveolar.....	60
<b>Figura 8-</b> Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) sobre os níveis de IgE no soro (painel A) e os níveis de eotaxina no lavado broncoalveolar (painel B).....	62

## **RESUMO**

Os inibidores das óxido nítrico sintases (NOS) são amplamente utilizados para avaliar a contribuição do NO na alergia pulmonar, mas os dados obtidos pela utilização de tais inibidores são controversos. Neste estudo, ensaios farmacológicos, bioquímicos e farmacocinéticos foram realizados para se avaliar os efeitos dos tratamentos agudo e crônico com o inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, assim como do inibidor seletivo para NOS induzível (iNOS), aminoguanidina, sobre a inflamação das vias aéreas em camundongos BALB/c desafiados com ovalbumina (OVA). O tratamento crônico com L-NAME (50 e 150 mg/kg/dia, por três semanas) aumentou significativamente o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) de animais desafiados com ovalbumina (OVA;  $0,19 \pm 0,02$  e  $0,34 \pm 0,03 \times 10^6$  células/LBA, respectivamente;  $P < 0,0001$ ) em relação aos não tratados ( $0,13 \pm 0,02 \times 10^6$  células/LBA). No parênquima pulmonar, o tratamento crônico com L-NAME (150 mg/kg/dia) também elevou significativamente o número de eosinófilos nos animais desafiados com OVA em relação aos animais não tratados ( $27,0 \pm 5,1$  e  $18,2 \pm 1,6$  eosinófilos/brônquio, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Contrariamente, os tratamentos agudo com L-NAME (50 mg/kg; gavagem 30 min antes do primeiro desafio com OVA) e crônico com aminoguanidina (20 mg/kg/dia, por três semanas) reduziram o número de eosinófilos no LBA ( $0,05 \pm 0,01$  e  $0,04 \pm 0,02 \times 10^6$  células/LBA, respectivamente;  $P < 0,05$ ) em relação ao controle. Os tratamentos agudo e crônico com L-NAME reduziram a atividade da NOS constitutiva (cNOS) no cérebro em relação aos animais não tratados (tratamento agudo:  $5,8 \pm 0,4$  e  $3,6 \pm 0,2$  pmol/min/mg de proteína; tratamento crônico:  $5,7 \pm 0,3$  e  $0,7 \pm 0,2$  pmol/min/mg de proteína, para controle e tratado, respectivamente;  $P < 0,05$ ). A atividade da NOS induzível (iNOS) pulmonar foi significativamente reduzida pelos tratamentos agudo com L-NAME e crônico com aminoguanidina ( $0,7 \pm 0,05$  e  $0,04 \pm 0,02$  pmol/min/mg de proteína, respectivamente;  $P < 0,05$ ) em relação aos animais não tratados ( $1,2 \pm 0,2$  pmol/min/mg de proteína). Contudo, o tratamento crônico com L-NAME não afetou a atividade da iNOS pulmonar. Os níveis séricos de IgE mostraram-se elevados nos animais desafiados com OVA, mas não foram afetados por nenhum dos tratamentos. O tratamento crônico com aminoguanidina (mas não o tratamento crônico com L-NAME) reduziu os níveis elevados de eotaxina no LBA ( $3,4 \pm 1,2$  e  $1,0 \pm 0,5$  pg/ml, para controle e tratado, respectivamente;  $P < 0,05$ ). As reduções dos níveis de  $\text{NO}_x$  no LBA pelos tratamentos agudo com L-NAME

e crônico com aminoguanidina ( $1,8 \pm 0,4$  e  $0,6 \pm 0,3$   $\mu\text{M}$ , respectivamente) foram maiores quando comparadas ao tratamento crônico com L-NAME ( $6,8 \pm 0,6$   $\mu\text{M}$ ) em relação aos animais não tratados ( $8,8 \pm 0,8$   $\mu\text{M}$ ). Os protocolos farmacocinéticos mostraram que o L-NAME não é biodisponível quando dado via oral. As concentrações séricas do metabólito do L-NAME, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina, diminuíram progressivamente de 30 min a 24 horas após a administração (72,0 a 32,1 ng/mL). No tratamento crônico com L-NAME, a concentração do N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (16,2 ng/mL) mostrou-se próxima do limite de detecção do método (10 ng/ml). Em conclusão, o tratamento crônico com L-NAME por três semanas produziu baixas concentrações séricas do N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina, causando inibição preferencial da atividade da cNOS. Portanto, a potenciação do influxo de eosinófilos pelo tratamento crônico com L-NAME supostamente remove o NO protetor derivado da cNOS, com nenhuma interferência sobre o agravamento da inflamação devido ao NO oriundo da iNOS.

**ABSTRACT**

Nitric oxide synthase (NOS) inhibitors are largely used to evaluate the NO contribution to pulmonary allergy, but contrasting data have been obtained. In this study, pharmacological, biochemical and pharmacokinetic studies were performed to evaluate the effects of acute and chronic treatment of BALB/C mice with non-selective (L-NAME) and selective (aminoguanidine) NOS inhibitors in ovalbumin (OVA)-challenged mice. Long-term L-NAME treatment (50 and 150 mg/kg/day, three weeks) significantly increased the eosinophil number in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid ( $0.19 \pm 0.02$  and  $0.34 \pm 0.03 \times 10^6$  cells / BAL, respectively;  $P < 0.0001$ ) in comparison with non-treated animals ( $0.13 \pm 0.02 \times 10^6$  cells / BAL). In the bronchiolar parenchyma, chronic L-NAME treatment (150 mg/kg/day) also increased the eosinophil number ( $18.2 \pm 1.6$  and  $27.0 \pm 5.1$  eosinophils/bronchio, for treated and untreated, respectively;  $P < 0.05$ ). On the other hand, acute L-NAME (50 mg/kg, given by gavage 30 min prior to the first OVA challenge) and aminoguanidine (20 mg/kg/day, three weeks) rather reduced the eosinophil number ( $0.05 \pm 0.0$  and  $0.04 \pm 0.02 \times 10^6$  cells / BAL, respectively;  $P < 0.05$ ). Chronic and acute L-NAME treatments markedly reduced the constitutive NOS (cNOS) activity in brain ( $0.7 \pm 0.2$  and  $3.6 \pm 0.2$  pmol/min/mg of protein, respectively;  $P < 0.05$ ) in comparison with untreated animals ( $5.7 \pm 0.3$  and  $5.8 \pm 0.4$  pmol/min/mg of protein, respectively). The inducible pulmonary NOS (iNOS) activity was markedly reduced by acute L-NAME and aminoguanidine ( $0.7 \pm 0.05$  and  $0.04 \pm 0.02$  pmol/min/mg of protein, respectively;  $P < 0.05$ ) compared with untreated animals ( $1.2 \pm 0.2$  pmol/min/mg of protein). In contrast, chronic L-NAME failed to affect the iNOS activity. The increased serum IgE levels seen in OVA-challenged animals were not affected by any treatment. Aminoguanidine (but not chronic L-NAME) restored the increased eotaxin levels in BAL ( $3.4 \pm 1.2$  and  $1.0 \pm 0.5$  pg/ml;  $P < 0.05$ ). The  $\text{NO}_x^-$  levels in BAL fluid were reduced by both acute and chronic L-NAME, as well as by aminoguanidine ( $1.8 \pm 0.4$ ,  $6.8 \pm 0.6$  and  $0.6 \pm 0.3$   $\mu\text{M}$ , respectively;  $P < 0.05$ ) compared with untreated animals ( $8.8 \pm 0.8$   $\mu\text{M}$ ); however, the reductions of  $\text{NO}_x^-$  levels by acute L-NAME and aminoguanidine were significantly higher than the chronic L-NAME treatment. The pharmacokinetic protocols showed that L-NAME *per se* is not bioavailable when given *per os*. The serum concentrations of its metabolite  $\text{N}^0$ -nitro-L-arginine decreased from 30 min to 24 h (72.0 to 32.1 ng/mL) after acute L-NAME intake. In chronic treatment,  $\text{N}^0$ -nitro-L-arginine concentration (16.2 ng/mL) was

close to the detection limit (10 ng/mL). In conclusion, 3-week treatment with L-NAME yields low serum N<sup>0</sup>-nitro-L-arginine concentrations, causing a preferential inhibition of cNOS activity. Therefore, potentiation of eosinophil influx by chronic L-NAME reflects a removal of protective cNOS-derived NO, with no interference on the ongoing inflammation due to iNOS-derived NO.

## **1- INTRODUÇÃO**

## 1.1- Asma

Nos últimos 40 anos houve um nítido aumento global na prevalência, morbidade, mortalidade e ônus econômico associado à asma, principalmente em crianças. Estima-se que 300 milhões de pessoas em todo o mundo tenham asma, com aproximadamente 180 mil mortes anuais, no planeta. O ônus financeiro, de 300 a 1300 dólares por paciente por ano, incide de forma variada sobre os asmáticos, sendo que aqueles portadores da asma grave são os mais afetados (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC*, 1998; *World Health Organization*, 2004; Masoli et al., 2004; Cooper et al., 2006; Eder et al., 2006; Braman, 2006; Ward e Selgrade, 2006). No Brasil, ocorrem anualmente cerca de 350.000 internações por asma, constituindo-se a quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde – SUS (2,3% do total), sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens. Em 1996, os custos do SUS com internações por esta doença foram de aproximadamente 76 milhões de reais (2,8% do gasto total anual) e o terceiro maior valor gasto com uma enfermidade. Além dos altos custos hospitalares, é imputado à asma um elevado índice de morbidade, sendo um importante dado relacionado às ausências escolar e laborativa. Duas mil mortes anuais são decorrentes da asma segundo o órgão do governo (Ministério da Saúde, 2000). Um estudo multicêntrico realizado em 56 países mostrou uma variabilidade da asma ativa de 1,6% a 36,8%, posicionando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência de 20% (ISAAC, 1998).

Na definição atual, a asma é reconhecida como uma doença inflamatório-crônica das vias aéreas na qual várias células e elementos celulares desempenham funções importantes. A inflamação crônica está associada à hiperreatividade das vias aéreas que conduz a episódios recorrentes de sibilos, chiado, respiração curta e ofegante, crise de dispnéia, deposição de muco na árvore brônquica e tosse, particularmente à noite ou ao amanhecer. Estes episódios podem estar associados à obstrução variável do fluxo aéreo que é freqüentemente reversível (espontaneamente) ou com tratamento farmacológico adequado (Masoli et al., 2004). É uma doença episódica, alternando crises agudas com períodos assintomáticos e, embora rara, uma crise aguda pode levar à morte (Kroegel et al., 1993; McFadden, 1994). A asma é decorrente de interações complexas entre fatores externos e genéticos (Vargaftig, 1999; Bochner e Busse, 2005; Pearce e Douwes, 2006; Cooper et al., 2006). Evidências científicas associam a hiperreatividade à inflamação das vias

aéreas, mas a natureza desta interação ainda não é clara (Cockcroft e Davis, 2006; Trivedi e Lloyd, 2007).

A asma é tradicionalmente dividida em 2 tipos básicos: asma intrínseca e extrínseca (Corrigan e Kay, 1992; Robbins et al., 1994; Ying et al., 1999). A asma intrínseca apresenta história negativa para alergia, testes cutâneos e níveis séricos de IgE normais. Neste caso, os pacientes desenvolvem os sintomas típicos de asma após contato com certos estímulos como infecção viral ou bacteriana (Corrigan e Kay, 1992; Kroegel et al., 1993; McFadden, 1994), ar frio, inalantes irritantes (ex: dióxido de enxofre), drogas (ex: aspirina), estresse emocional e exercícios físicos (Robbins et al., 1994; Busse e Lemanske, 2001).

A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica), ocupacional e aspergilose broncopulmonar alérgica (Robbins et al., 1994; Smit e Lukacs, 2006). A asma alérgica é a mais comum, e está frequentemente associada a um histórico familiar de atopia. É desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, no pólen, nos pêlos de animais, em alguns alimentos, dentre outros. As crises agudas podem ser precedidas por manifestações de doenças alérgicas como rinite, urticária ou eczema, reações cutâneas positivas à injeção intradérmica de extratos de antígenos, níveis elevados de IgE no soro e/ou respostas positivas a testes de provocação os quais envolvem a inalação de antígeno específico (Kroegel et al., 1993; McFadden, 1994; Robbins et al., 1994; Pastva et al., 2004).

## **1.2- Eosinófilos e asma**

Pacientes asmáticos apresentam número elevado de eosinófilos no sangue e no lavado broncoalveolar (LBA), e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas, como mastócitos, monócitos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (Corrigan e Kay, 1992; Sato et al., 1999; Prussin e Metcalfe, 2006; Trivedi e Lloyd, 2007).

A importância dos eosinófilos na asma foi enfatizada pelos achados que correlacionavam o grau de eosinofilia no sangue e no LBA com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da doença (Gonzalo et al., 1998; Sato et al., 1999; Trivedi e Lloyd, 2007). Entretanto, admite-se atualmente que o papel dos eosinófilos no desencadeamento da hiperreatividade brônquica é controverso, já que se demonstrou que a

hiperreatividade pode ocorrer na ausência de inflamação eosinofílica (Giembycz, 2001; Smit e Lukacs, 2006; Jacobsen et al., 2007).

Os achados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos de asma experimental mostram que os eosinófilos têm um papel importante nesta patologia; sendo assim, seu acúmulo seletivo e ativação na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese da asma (Weller, 1991; Shahabuddin et al., 2000).

Os eosinófilos foram primeiramente descritos por Paul Ehrlich em 1879 (Trivedi e Lloyd, 2007). São células com núcleo bilobado, destituído de nucléolo, que possuem corpúsculos lipídicos, principal depósito de ácido araquidônico, e grânulos citoplasmáticos. Derivam de células progenitoras hematopoiéticas CD 34<sup>+</sup> na medula óssea que, sob ação da interleucina(IL)-3, IL-5 e fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) se diferenciam de seus precursores mielóides em eosinófilos (Telles Filho, 2004; Rosenberg et al., 2007; Trivedi e Lloyd, 2007).

Eosinófilos ativados liberam substâncias citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio e proteínas tóxicas como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e peroxidase do eosinófilo (EPO), além de produzirem e liberarem vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Giembycz e Lindsay, 1999; Foster, 1999; Powell et al., 2001; Rothenberg e Hogan, 2006; Ten Broeke et al., 2006; Trivedi e Lloyd, 2007).

Dentre as citocinas supracitadas, a IL-5 é a mais específica para a linhagem eosinofílica sendo responsável pelo crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência desses leucócitos (Sanderson, 1992; Collins et al., 1995; Rothenberg et al., 2006). A eotaxina exerce atração específica sobre os eosinófilos, atuando predominantemente em receptores CCR-3 (Murphy, 1994; Daugherty et al., 1996; Ponath et al., 1996; Broide et al., 1999; Zimmermann et al., 2003). O mecanismo que promove o recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório ainda não está completamente elucidado; porém, evidências apontam para o envolvimento de algumas citocinas como IL-3, GM-CSF e IL-5, e quimiocinas, principalmente a eotaxina (Giembycz e Lindsay, 1999; Shahabuddin et al., 2000; Murray et al., 2006; Pease e Williams, 2006; Rosenberg et al., 2007). Supõe-se que a IL-5 e

a eotaxina ajam cooperativamente neste evento onde a IL-5 atua ativando e aumentando o número de eosinófilos em resposta à eotaxina (Mould et al., 1997, Palframan et al., 1998; Rothenberg et al., 2006; Hogan et al., 2008).

A transmigração de eosinófilos para o sítio de inflamação alérgica é realizada através do endotélio vascular por um processo que envolve rolamento, adesão, firme adesão e migração transendotelial (Wardlaw et al., 1994; Wardlaw, 2000).

As moléculas de adesão são glicoproteínas expressas na superfície celular e promovem o contato entre duas células ou entre as células e a matriz extracelular. As principais famílias de moléculas de adesão são as selectinas, as integrinas e a superfamília das imunoglobulinas.

A família das selectinas é formada por três proteínas: E-selectina, P-selectina e a L-selectina. A E-selectina é sintetizada e expressa exclusivamente no endotélio vascular após estimulação com citocinas e lipopolissacarídeos. A P-selectina é sintetizada constitutivamente pelas plaquetas e por células endoteliais, e armazenadas nos granulos  $\alpha$  e nos corpúsculos de Weibel-Palade, respectivamente. A E-selectina e P-selectina são encontradas na superfície endotelial e funcionam como sítios de ligação para a L-selectina (encontrada constitutivamente na superfície da maioria dos leucócitos). As integrinas são glicoproteínas transmembranares também encontradas nos leucócitos. São constituídas por dois heterodímeros não-covalentes, designados subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que cada subunidade possui um grande domínio extracelular e diminuta porção citoplasmática. A integrina predominante nos leucócitos pertence à subfamília  $\beta_2$  (Lampinen et al., 2004; Rothenberg et al., 2006; Hogan et al., 2008). As imunoglobulinas ou anticorpos são um grupo de glicoproteínas presentes no soro e nos líquidos orgânicos. São produzidas pelos linfócitos B, precursores que, depois de sensibilizados, isto é, depois de terem entrado em contato com o antígeno, originam os plasmócitos de diferentes linhagens e clones celulares, que irão produzir as cinco frações de imunoglobulinas, denominadas imunoglobulinas G, A, M, D e E. Apesar de apresentarem muitas semelhanças, diferem entre si no tamanho, na composição de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e na carga elétrica. São produzidos com a função principal de neutralizar e eliminar o antígeno que estimulou a sua produção. Esse processo de eliminação é feito de diversas formas, através da fixação do

complemento, opsonização, reação anafilática (desgranulação de mastócitos), neutralização da substância, aglutinação, dentre outros (Buck, 1992; Montefort et al., 1993; Levy, 1996).

As seqüências iniciais executadas pelos eosinófilos são o rolamento, reguladas pelas L-selectinas e seus contra-ligantes expressos no endotélio (CD34 e MAdCAM-1), e a adesão que ocorre com PSGL-1 interagindo com as E- e P-selectinas endoteliais. A firme adesão e a transmigração através do endotélio vascular para o tecido, executadas pelos eosinófilos, são reguladas pelas interações coordenadas entre as citocinas e as quimiocinas, as moléculas de adesão expressas na superfície dos eosinófilos (selectinas e integrinas, principalmente VLA-4 e Mac-1) e seus contra-ligantes VCAM-1, MAdCAM-1 e ICAM-1 expressos na superfície das células endoteliais vasculares (Lampinen et al., 2004; Rothenberg et al., 2006; Hogan et al., 2008).

### **1.3- Modelos de asma experimental**

Ainda se aceita que o método mais abrangente para a compreensão da patologia da asma seja o modelo animal (Howat et al., 2002; Eriksson et al., 2005; Barnes, 2006; Zosky e Sly, 2007). O modelo de asma em animais tem sido utilizado há mais de 100 anos (Karol MH, 1994). Várias espécies animais têm sido usadas incluindo a cobaia, o cão, o rato, o camundongo, o coelho, a ovelha e o macaco (Renz et al., 1992; Woolley et al., 1994; Gaspar Elsas et al., 1997; Petrolani et al., 1988; O'Byrne, et al., 1999; Lintomen et al., 2002; Arts e Kuper, 2006; Ward e Selgrade, 2006; Zosky e Sly, 2007). Entretanto, apesar de utilizarmos o termo "modelo de asma", ainda não existe um modelo experimental ideal que mimetize a asma humana (Vargaftig, 1999; Szelenyi, 2000; Smit & Lukacs, 2006). Embora os modelos em ratos e cobaias sejam relevantes, o modelo murino é mais usado devido à disponibilidade de ferramentas imunológicas, como linhagens de camundongos isogênicos, *knockouts* e transgênicos; disponibilidade de anticorpos e proteínas recombinantes (Dietrich et al., 1996; Elias et al., 2003). Na realidade, o que existem são modelos de inflamação alérgica que reproduzem algumas características da doença (Vargaftig, 1999). Sendo assim, modelos murinos são usados porque exibem pelo menos duas das características mais importantes da asma: a inflamação e a hiperreatividade das vias aéreas (Whitehead et al., 2003;

Smit & Lukacs, 2006; Zosky e Sly, 2007). O modelo experimental de asma mais usual é o de hiperreatividade e inflamação broncopulmonar induzidas por alérgeno. O procedimento mais freqüentemente utilizado é a indução de um estado alérgico, frente ao uso de antígeno conhecido, como a ovalbumina (OVA), onde normalmente se empregam 2 injeções deste alérgeno associado ao alúmen (hidróxido de alumínio). O alúmen é o adjuvante do sistema, que é amplamente usado para a indução da síntese de anticorpos, particularmente da classe IgE. A administração de antígenos protéicos, associado ao alúmen, resulta em imunidade mediada por células e formação de anticorpos (no caso, com uma importante proporção de IgE), dependente de células T (no caso, células Th<sub>2</sub>) (Brewer et al., 1999; Kips et al., 2003). A hiperreatividade e a inflamação broncopulmonar podem ser observadas nestes animais sensibilizados, após a provocação (intranasal, aerosol, instilação ou intratraqueal) com o antígeno (Renz et al., 1992; Kung et al., 1994; Egan et al., 1995; Petrolani et al., 1988; Ferreira et al., 2004).

Uma das principais críticas a esse modelo animal tão comum é a falta de cronicidade da resposta à exposição alérgica seguida à sensibilização (Fulkerson et al., 2005). Os camundongos são atualmente e, provavelmente, permanecerão sendo o modelo animal mais popular simplesmente por causa da tecnologia disponível para manipular e explorar sua biologia. Eles constituem um recurso efetivo de geração de hipóteses que pode, então, ser extrapolado e testado em humanos asmáticos (Ward e Selgrade, 2006; Zosky e Sly, 2007).

#### **1.4- Óxido nítrico (NO)**

O NO constitui-se num radical livre, gasoso, inorgânico e incolor (Dusse et al., 2003). A síntese do NO inicia-se, numa primeira etapa, pela hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina (aminoácido semi-essencial) gerando N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina com utilização da nicotinamida adenina difosfato (NADPH), oxigênio e, provavelmente, o complexo heme (ferro-protoporfirina IX). Na etapa seguinte há a conversão da N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina em NO e L-citrulina onde participam a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como co-fatores, reação essa catalizada pelas óxido nítrico sintases (NOS).

As NOS existem em três isoformas que são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e de calmodulina, e a NOS induzível (iNOS).

As isoformas constitutivas são a NOS neural (nNOS ou tipo I), presente normalmente em neurônios, e a NOS endotelial (eNOS ou tipo III), encontrada nas células endoteliais vasculares, nas plaquetas e nas células epiteliais. A iNOS é produzida por uma variedade de células, incluindo-se linfócitos T, macrófagos, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos, plaquetas, fibroblastos pulmonares, células da musculatura lisa e células epiteliais das vias aéreas.

A iNOS e a cNOS diferem quanto à capacidade de síntese de NO, à forma de ativação e ao peso molecular (Alderton et al., 2001; Fischer et al., 2002; Dusse et al., 2003; Ten Broeke et al., 2006; Choi et al., 2006). A cNOS produz, em segundos, ínfimas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que é controlada pelos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. A isoforma nNOS possui peso molecular de 161 KDa (1434aa) e a eNOS de 133 KDa (1203aa) e localizam-se, respectivamente, nos cromossomas humanos 12 e 7. A iNOS não é produzida em condições normais, mas sim induzida por agentes pró-inflamatórios, incluindo a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e o INF- $\gamma$ , além de fatores exógenos como infecção viral e produtos bacterianos. É necessária várias horas para a iNOS ser expressa, quando então libera grandes quantidades de NO ( $\mu\text{mols}$ ) de forma contínua até que eventualmente ocorra a morte celular. Esta isoforma tem peso molecular de 131 KDa (1153aa) e localiza-se no cromossoma humano 17 (Barnes e Liew, 1995; Alderton et al., 2001; Fischer et al., 2002; Dusse et al., 2003).

O NO é um dos mais importantes mediadores de processos fisiopatológicos, desempenhando função como mensageiro ou modulador de várias atividades biológicas essenciais. Muitas das ações do NO são mediadas pela ativação da guanilil ciclase solúvel e conseqüente aumento da concentração de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) nas células-alvo (Moncada e Higgs, 1993; Persichini et al., 2002; Ferreira et al., 2006; Bove e van der Vliet, 2006).

#### 1.4.1- Óxido nítrico e asma

O NO é produzido por vários tipos celulares e tem papel-chave na regulação de múltiplas funções biológicas. O NO tem sido apontado como potencial mediador na inflamação asmática (Thomassen et al., 1999; Dusse et al., 2003). Animais submetidos ao desafio alergênico e pacientes asmáticos apresentam níveis aumentados de NO no ar exalado (Barnes e Liew, 1995; Thomassen et al., 1999; Eynott et al., 2002; Donnelly e Barnes, 2002; Hjoberg et al., 2004; Bochner e Busse, 2005; Kobayashi et al., 2005). Embora a fonte exata deste NO não esteja esclarecida, há indícios de que seja advindo da iNOS produzida pelas células epiteliais das vias aéreas inferiores (Hjoberg et al., 2004; Iijima et al., 2005). Xiong e colaboradores (1999) mostraram, utilizando modelo de inflamação alérgica das vias aéreas, que camundongos *knockout* para a iNOS têm as manifestações da doença bastante reduzidas, incluindo redução da infiltração de eosinófilos.

Eynott e colaboradores (2002) mostraram, em ratos submetidos ao desafio alergênico, que os níveis de NO exalado estão suprimidos pelo SC-51 (inibidor seletivo da iNOS), indicando que o aumento do NO exalado deve ser derivado da iNOS. Por outro lado, apesar da hiperreatividade brônquica ter sido suprimida, os animais não apresentaram redução da inflamação eosinofílica pulmonar.

Outros trabalhos conduzidos em animais sensibilizados com antígeno mostraram que L-NMMA e aminoguanidina (ambos inibidores de NOS) inibiram o influxo de células inflamatórias induzido pelo alérgeno. A L-arginina (substrato da NOS) reverteu o fenômeno e aumentou o influxo celular, enquanto a D-arginina (enantiômero não ativo) não causou efeito. Esses trabalhos apóiam o conceito de que o NO, através da iNOS, exerce um papel importante na migração de células inflamatórias (Tulic et al., 2000; Iijima et al., 2005). Outro estudo em pacientes asmáticos mostrou que o desafio com alérgeno nas vias aéreas eleva os níveis de NO local; o LBA tem número aumentado de eosinófilos e níveis elevados de citocinas (GM-CSF e MIP-1 $\alpha$ ), apoiando a correlação entre níveis elevados de NO nas vias aéreas e o desenvolvimento da resposta inflamatória pulmonar alérgica (Thomassen et al., 1999; O'Byrne, 2001).

Em eosinófilos de ratos (Zanardo et al., 1997) e humanos (Thomazzi et al., 2001), inibidores de NOS reduzem a quimiotaxia dos eosinófilos *in vitro*. O tratamento crônico de ratos com L-NAME reduz a migração de eosinófilos *in vivo* em modelo não alérgico (Ferreira et al., 1996) e alérgico de inflamação pulmonar (Ferreira et al., 1998).

Recentemente, Landgraf e colaboradores (2005) investigaram a infiltração de células inflamatórias, a hiperreatividade brônquica e a secreção de muco na inflamação alérgica pulmonar em camundongos submetidos ao tratamento agudo com inibidores da síntese de NO (L-NAME e aminoguanidina), e em camundongos *knockout* para iNOS. Surpreendentemente, dentre os parâmetros analisados, o número de eosinófilos no LBA dos camundongos iNOS<sup>-/-</sup> não foram significativamente diferentes dos animais controle; além disso, o tratamento de camundongos iNOS<sup>-/-</sup> com L-NAME (ou aminoguanidina) não afetou estes parâmetros.

Como relatado acima, a função do NO na regulação da resposta inflamatória de natureza alérgica ainda é bastante controversa. Nosso grupo tem se preocupado em contribuir para a compreensão da função do NO na inflamação alérgica desde meados da década de noventa. No nosso entender, fomos os primeiros a relatar o efeito inibitório (seletivo) de inibidores da síntese do NO sobre a migração *in vitro* e *in vivo* de eosinófilos de ratos (Ferreira et al., 1996). A partir deste estudo, publicamos outros, quer utilizando modelos de alergia em ratos tratados cronicamente com L-NAME (Ferreira et al., 1998, 2004), quer utilizando eosinófilos isolados de sangue de indivíduos saudáveis (Conran et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Thomazzi et al., 2001; 2004, 2005; veja Ferreira et al., 2006). No momento em que o presente projeto foi pensado, decidimos, inicialmente, transpor o modelo de tratamento crônico com L-NAME em ratos para camundongos. O camundongo, sabidamente, apresenta vantagens quanto à exploração na pesquisa experimental pela disponibilidade comercial de anticorpos (kits ELISA, por exemplo) para a grande maioria das moléculas (mediadores inflamatórios, moléculas de adesão, receptores, imunoglobinas). Assim, nosso plano inicial era apenas caracterizar a inibição do infiltrado eosinofílico pelo L-NAME crônico em camundongos, tal qual obtínhamos no rato, para podermos continuar nossos estudos com novas abordagens farmacológicas. Nos primeiros protocolos experimentais, fomos surpreendidos pelo efeito

“oposto” do L-NAME crônico em camundongos (potencialização em vez de redução do infiltrado eosinofílico no LBA). O protocolo foi repetido e confirmado várias vezes. Por conta deste resultado “inesperado”, redirecionamos totalmente a idéia original do projeto, passando a nos preocupar com o entendimento da potencialização do influxo eosinofílico para o LBA em camundongos desafiados com OVA e tratados cronicamente com L-NAME, comparado aos tratamentos agudo com este inibidor e crônico com a aminoguanidina (inibidor seletivo para a iNOS).

## 1.5- Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi esclarecer o efeito de inibidores não-seletivos e seletivos da NOS (L-NAME e aminoguanidina), administrados aguda e cronicamente, sobre a migração de eosinófilos para as vias aéreas de camundongos previamente sensibilizados e desafiados com OVA.

### 1.5.1- Objetivos específicos

Em camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA, tratados com L-NAME ou aminoguanidina (e seus respectivos controles), foram objetivos:

- i) Quantificar o número de leucócitos totais (com ênfase para os eosinófilos) no LBA, medula óssea e sangue periférico;
- ii) Quantificar as atividades da NOS cerebral e pulmonar;
- iii) Quantificar os níveis dos metabólitos de  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ), eotaxina, IL-5 e IgE no LBA e/ou soro;
- iv) Avaliar a histopatologia pulmonar;
- v) Avaliar a farmacocinética do L-NAME, quantificando-se a concentração de L-NAME e de seu metabólito,  $\text{N}^0$ -nitro-L-arginina (LNA), no soro dos animais.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

## **2.1- Animais**

Utilizaram-se camundongos BALB/c machos de 20 a 25 g. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP) e transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia onde permaneceram a 24°C e iluminação periódica diária de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – IB – UNICAMP) sob nº 971-1.

## **2.2- Tratamentos com L-NAME e aminoguanidina**

Os tratamentos crônicos com L-NAME, nas doses de 50 e 150 mg/kg/dia, e aminoguanidina, na dose de 20 mg/kg/dia, foram feitos por 3 semanas, através de ingestão hídrica (adicionados na “água de beber”). As drogas foram pesadas e transferidas para um frasco onde se verteu 150 mL de água sob branda agitação. Os animais eram pesados a cada dois dias, no caso dos tratamentos crônicos, com o objetivo de se administrar acuradamente as doses propostas.

O tratamento agudo com L-NAME foi efetuado com a dose de 50 mg/kg, através de gavagem, ministrada 30 minutos antes do primeiro desafio intranasal.

## **2.3- Sensibilização e desafio intranasal com OVA**

Cada camundongo recebeu injeção subcutânea dorsal de OVA (100 µg de OVA, dissolvida em 0,4 ml de soro fisiológico contendo 1,6 mg de hidróxido de alumínio) no dia zero e um reforço no dia 7. No dia 14, os animais foram desafiados por via intranasal com OVA (10 µg de OVA em 50 µl de soro fisiológico) 2 vezes, com intervalo de 6 horas entre os desafios. No dia seguinte, os animais foram novamente desafiados por mais 2 vezes, e mortos 48 horas após o primeiro desafio. O grupo controle (não-sensibilizado) recebeu insitilação intranasal com OVA da mesma forma como descrito acima.

O tratamento crônico dos animais com L-NAME ou aminoguanidina (veja acima o esquema de tratamento) iniciou 1 semana antes da primeira sensibilização com OVA, e continuou durante todo o período de sensibilização e desafio, totalizando 3 semanas de tratamento. Os animais tratados agudamente com L-NAME receberam a droga 30 min antes do primeiro desafio com OVA.

## **2.4- Coleta e contagem de células do sangue periférico, do lavado broncoalveolar e da medula óssea**

### **2.4.1- Sangue periférico**

Os animais foram anestesiados com FORANE<sup>®</sup> (isoflurano) e o sangue foi coletado da veia cava abdominal com seringa de 1 ml na ausência de anticoagulante. Imediatamente após a coleta, um volume mínimo do sangue (10  $\mu$ l) foi destinado à contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk) e à confecção de lâmina (esfregaço) para posterior contagem diferencial dos leucócitos (Panótico Rápido). A quantidade de sangue restante foi centrifugada (1000 x g por 10 minutos); o soro foi coletado e estocado a -80°C.

### **2.4.2- Lavado broncoalveolar (LBA)**

Os camundongos tiveram a traquéia exposta com o auxílio de material cirúrgico (pinça e tesoura pequenas); em seguida, a traquéia foi delicadamente canulada com um cateter (24G x 3/4"). Em seguida, amarrou-se delicadamente uma linha em volta da traquéia para que o cateter não se movesse e nem saísse do interior da traquéia. Posteriormente, através da cânula já fixada à traquéia, foram feitas 5 lavagens broncoalveolares com 300  $\mu$ l de PBS gelado. Ao término do método, recuperava-se um volume aproximado de 1,5 ml de LBA por camundongo. Após a coleta, o LBA foi centrifugado a 4°C (500 x g por 10 minutos), o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C. O *pellet* foi ressuspensão em 200  $\mu$ l de PBS e utilizado para contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk), para confecção de lâmina em citocentrífuga e para posterior contagem diferencial dos leucócitos (Panótico Rápido).

### 2.4.3- Medula óssea

Os dois fêmures de cada animal foram retirados com o auxílio de material cirúrgico (pinças e tesouras) e transferidos para uma placa de Petri pequena contendo 5 ml de PBS. O canal medular de cada osso foi lavado com o PBS contido na placa, utilizando-se uma seringa de 5 ml e uma agulha (25 x 0,70 mm ou 22G1). Após esse procedimento, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 ml e homogeneizado com uma pipeta paster. As células da medula óssea foram utilizadas para contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk), para a confecção de lâmina (citocentrífuga) e para posterior contagem diferencial dos leucócitos (Panótico Rápido). Através de critérios morfológicos e da coloração diferenciaram-se eosinófilos imaturos de eosinófilos maduros. Consideraram-se mieloblastos, promielócitos e mielócitos como eosinófilos imaturos; e metamielócitos, bastonetes e segmentados como sendo eosinófilos maduros.

### 2.5- Análise histológica

Após anestesia dos animais com cloral hidratado (1 g/kg, i.p.), os pulmões foram retirados, fixados em uma solução de formalina (10% em PBS) por 24 horas, e conservados em etanol (70%); desidratados em gradação alcóolica e posteriormente embebidos em xilol até a inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  foram corados com hematoxilina/eosina (corante H/E) para contagem dos eosinófilos no tecido. A quantidade de eosinófilos no parênquima pulmonar foi determinada ao microscópio, em uma área de 28  $\mu\text{m}^2$  circunjacente aos brônquios. Os valores representam a média de 10 brônquios examinados de forma aleatória sob um aumento de 250 x.

### 2.6- Dosagem de $\text{NO}_x$ ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ )

A detecção dos metabólitos do NO, nitrato e nitrito ( $\text{NO}_x$ ), no soro foi feita através da conversão de nitrato em nitrito através da enzima nitrato redutase, na presença de co-fatores e subsequente dosagem do nitrito com o reagente de Griess. Para tal, utilizamos o kit comercial da Cayman Chemical (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, catalog nº 780001).

## **2.7- Dosagem sérica de IgE**

A determinação de anticorpos da classe IgE no soro realizou-se através do método de ELISA com o kit comercial (Mouse IgE ELISA Quantitation Kit, catalog nº E90-115) da Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA).

## **2.8- Dosagem de IL-5**

A detecção e quantificação da citocina IL-5 tanto no soro quanto no LBA foi realizada pelo método de ELISA com o kit comercial (Quantikine recombinant mouse IL-5 Kit, catalog nº M5000) da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

## **2.9- Dosagem de eotaxina**

A determinação e quantificação da eotaxina no LBA fez-se pelo método de ELISA utilizando o kit comercial (Quantikine Mouse Eotaxin Immunoassay Kit, catalog nº MME00) da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

## **2.10- Dosagem da atividade das óxido nítrico sintases (NOS)**

O método utilizado é o descrito por Förstermann e col.(1990) e está baseado na conversão da [<sup>3</sup>H]L-arginina para [<sup>3</sup>H]-L-citrulina. As amostras de cérebros e pulmões mantiveram congeladas a -70°C até o momento do ensaio. Foram pesadas e homogeneizadas em 5 volumes do tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF e 1 mM de L-citrulina. Cinqüenta microlitros do homogenato foram incubados na presença de 1 mM de NADPH, 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e 10 µM de L-arginina contendo 100.000 cpm de [<sup>2,3,4,5-3</sup>H]-L-arginina mono hidrocloreto (Amersham Life Science, Inglaterra) num volume final de 100 µl à temperatura ambiente (25-27°C) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação

(exceto o PMSF e a L-citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5,4, contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5 min a 10,000 rpm; centrífuga Eppendorf Mod. 5412 - Alemanha) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte; Dowex AG 50X-8, Sigma Chem. Co., EUA). Os eluatos foram recolhidos em tubos de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados com os anteriores. Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação, a radioatividade foi medida durante 1 min em espectrômetro de cintilação (BECKMAN - EUA).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistiram na omissão do  $\text{CaCl}_2$  e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (afim de caracterizar o tipo da NOS quanto à dependência da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de incubação), ou na adição de 1 mM de L-NAME (inibição inespecífica da NOS).

As contagens foram corrigidas por subtração do “branco” (onde o homogenato do tecido foi adicionado após o tampão HEPES) e da contagem obtida pelos tubos que obtinham a presença de L-NAME correspondente de cada amostra. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à contagem total (os conteúdos destes tubos receberam  $[\text{}^2,3,4,5\text{-}^3\text{H}]\text{L-arginina}$  mono hidrocloreto diretamente nos tubos de cintilação) pela fórmula:

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times ((\text{cpm}_{\text{amostra}} - \text{cpm}_{\text{branco}}) - \text{cpm}_{\text{L-NAME}}) / \text{cpm}_{\text{totais}} / 30$$

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em min).

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976; kit comercial Bio Rad™, EUA) e a atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína. A atividade da NOS na presença de  $\text{CaCl}_2$  refere-se à atividade da NOS total, na ausência de  $\text{CaCl}_2$  à atividade da iNOS (que possuía EGTA no meio de incubação) e da diferença entre as atividades da NOS total e da iNOS obtém-se a atividade da cNOS.

## 2.11- Metodologia analítica para a quantificação de L-NAME e N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina no soro

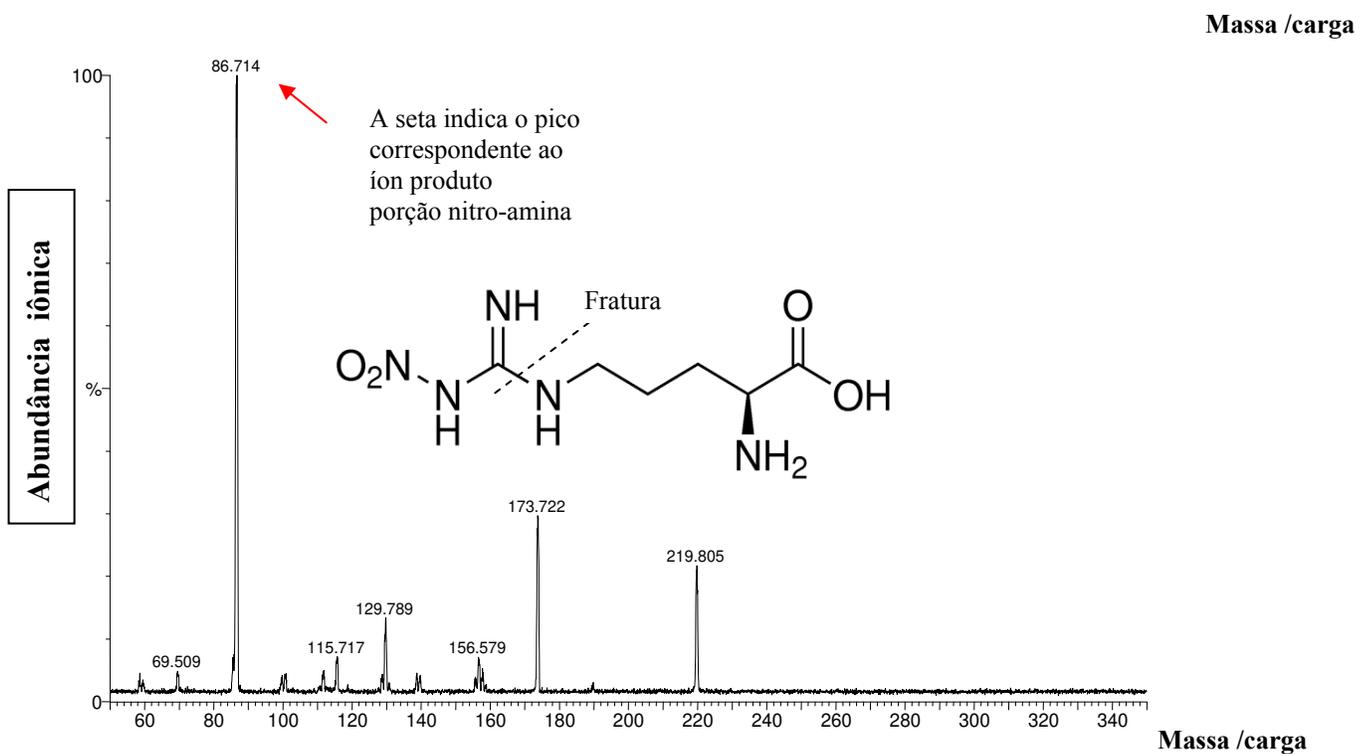
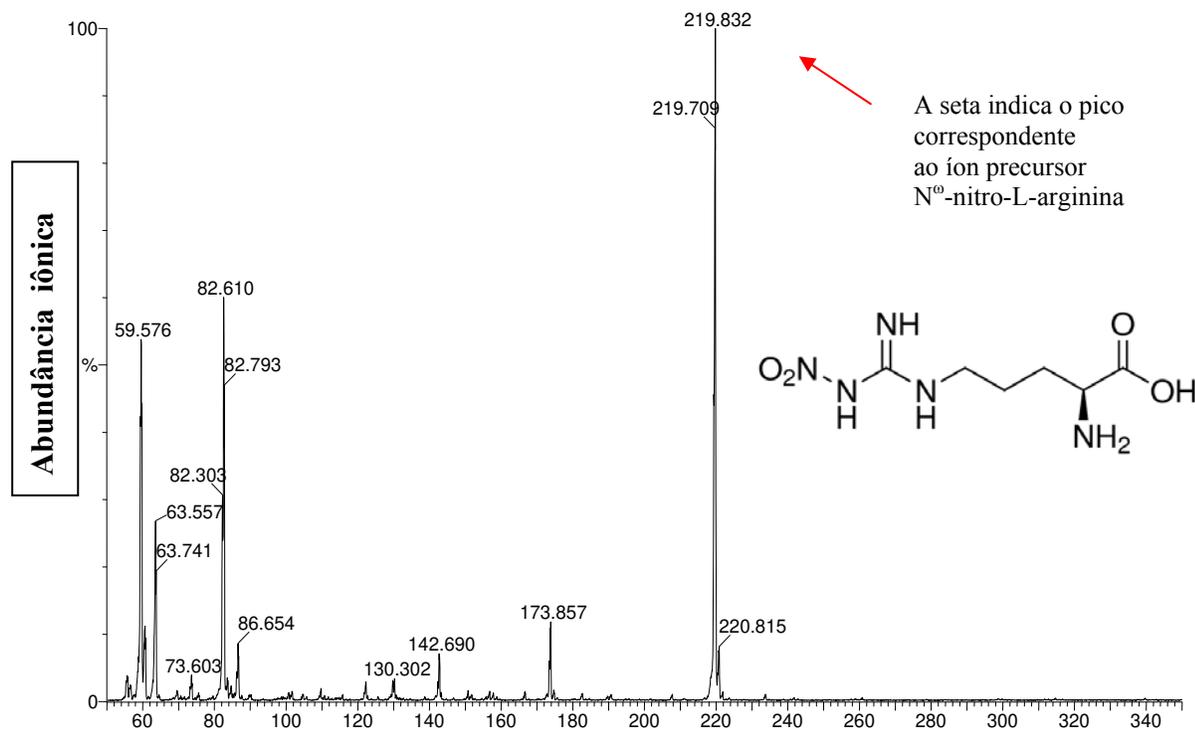
**Preparação da amostra:** todas as amostras de soro de camundongo, previamente congeladas, foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas a 2.550 g durante 5 minutos à 4°C. Número suficiente de colunas novas (Waters HLB Oasis<sup>®</sup> SPE) foi utilizado para o ensaio. Essas colunas foram ativadas com 1 mL de metanol, lavadas com 2 mL de água e pré-condicionadas com 3 mL de solução tampão de bicarbonato de Na<sup>+</sup> (pH 9,0). Cada solução de lavagem foi passada através das colunas sob baixa pressão. Cada amostra de soro (0,1 µL) e 0,5 µL da solução tampão de bicarbonato de Na<sup>+</sup> (pH 9,0) foram agitadas e aplicadas nas colunas já equilibradas (Waters HLB Oasis<sup>®</sup> SPE). Sob baixa pressão, as amostras foram retiradas lentamente das colunas. As colunas foram lavadas por 2 vezes com 1 mL de água. A lavagem foi realizada através das colunas sob baixa pressão. As colunas (Waters HLB Oasis<sup>®</sup> SPE) foram colocados em tubos de vidro, 12 x 120 milímetros, devidamente numerados. As colunas foram eluídas em seguida com 0,8 ml de metanol, que passaram através das colunas lentamente e foram coletados em tubos de vidro com a aplicação de uma leve pressão positiva através de um fluxo de nitrogênio (37°C). Este processo foi conduzido sob um exaustor. Os resíduos secos foram reconstituídos com 0,1 mL de metanol e agitados em vórtex por 15s. As soluções foram então transferidas para os microtubos do injetor automático.

**Análise das drogas:** O método analítico baseou-se em cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (LC-MS-MS; Quattro LC, Micromass / UK). A metodologia foi desenvolvida para a determinação de L-NAME e N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina no soro de camundongos. Os analitos foram extraídos das amostras séricas pela extração de fase sólida utilizando as colunas (Waters HLB Oasis<sup>®</sup> SPE). A cromatografia foi realizada numa coluna analítica de fase reversa (Sodex D-4) onde a fase móvel se constituía de Metanol / água (40:60 v / v) + 0,1% de ácido fórmico. O método teve um tempo total de execução cromatográfica de 4,0 min.

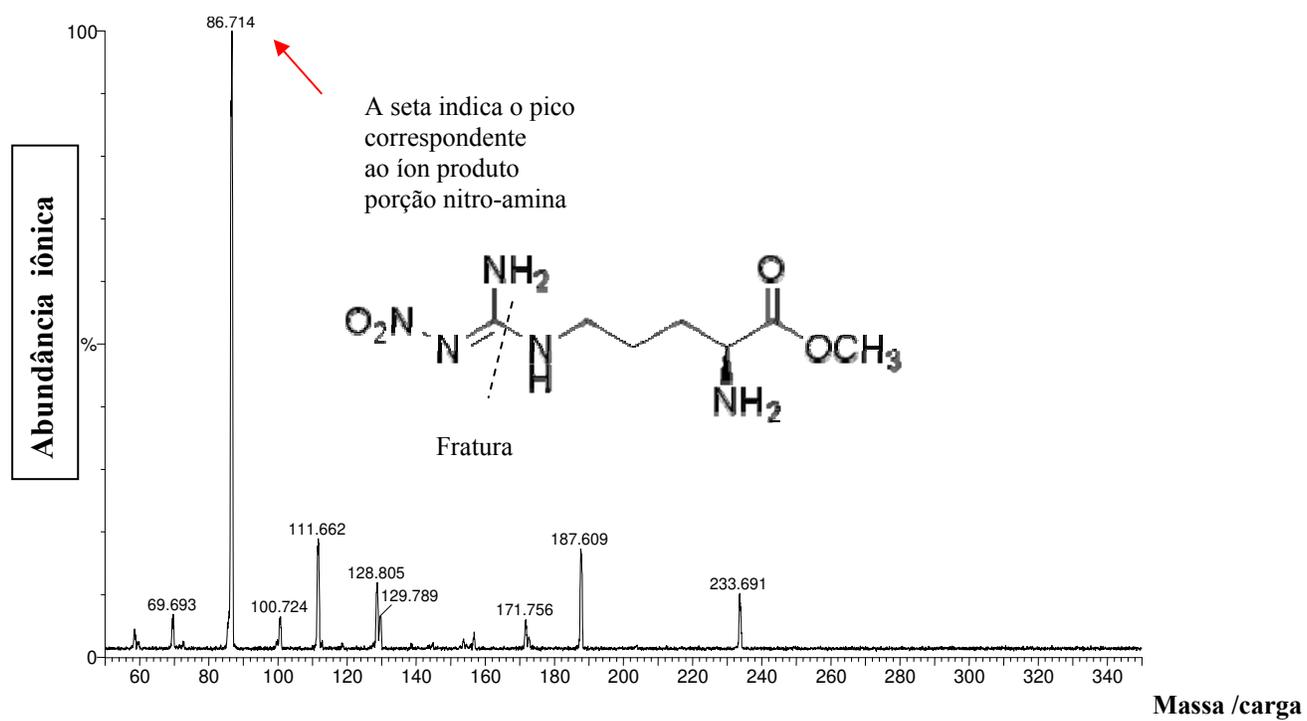
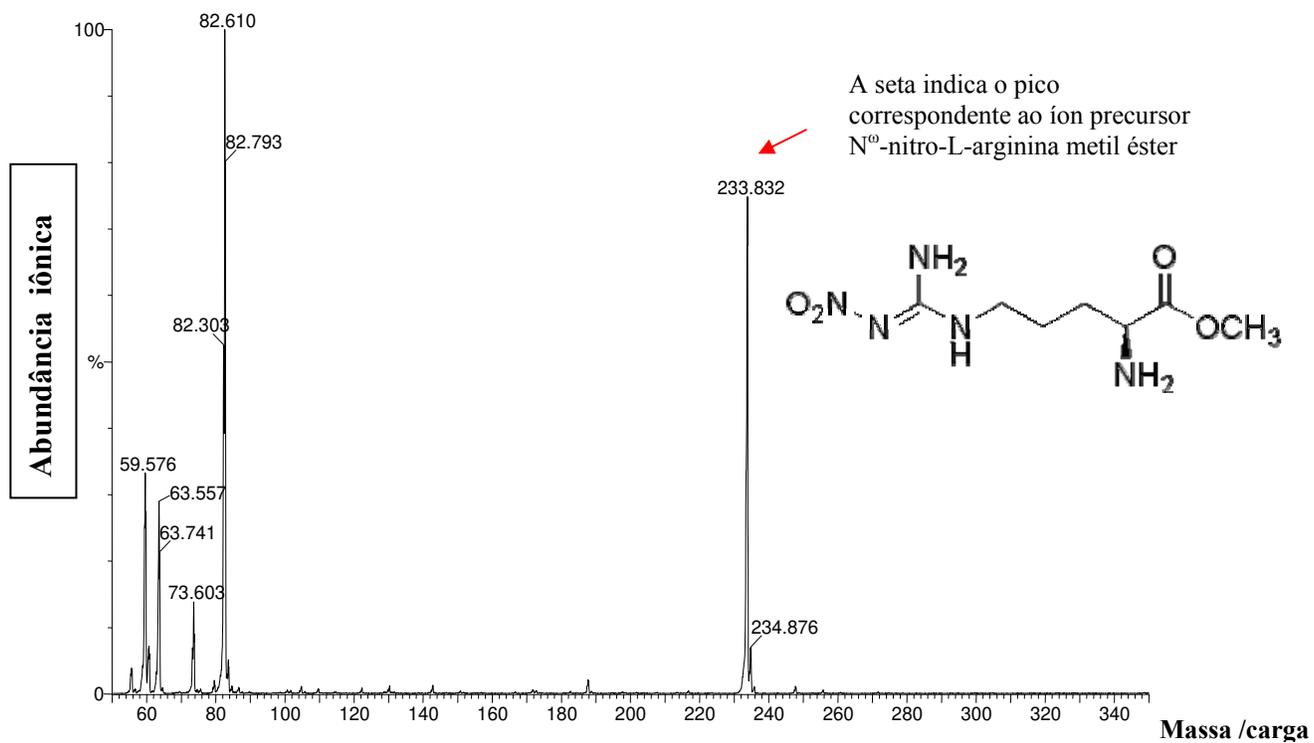
O método mais simples de regressão para as curvas de calibração foi  $y = a + bx$  de 10 a 500 ng / mL [curva  $y = a + bx$ ;  $39,0211 * x + 60,1582$  para N<sup>o</sup>-nitro-L-Arg ( $r^2 > 0,996971$ );  $47,5498 * x + 69,3503$  para o L-NAME ( $r^2 > 0,995758$ )]. O método foi validado para os parâmetros de recuperação, linearidade, exatidão e precisão.

Após determinada a metodologia analítica para o ensaio do L-NAME e de seu metabólito, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina, no soro de camundongos, obtiveram-se os espectros representativos dos picos de cada droga que são mostrados, logo abaixo.

## Espectros do N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina



## Espectros do L-NAME



## 2.12- Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (EPM) de  $n$  experimentos. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguido pelo teste de Tukey. Utilizou-se o teste  $t$  de *student* não pareado quando apropriado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

### **3- RESULTADOS**

### **3.1- Efeito dos tratamentos crônicos e agudo com L-NAME e/ou aminoguanidina sobre o número de eosinófilos**

#### **3.1.1- LBA**

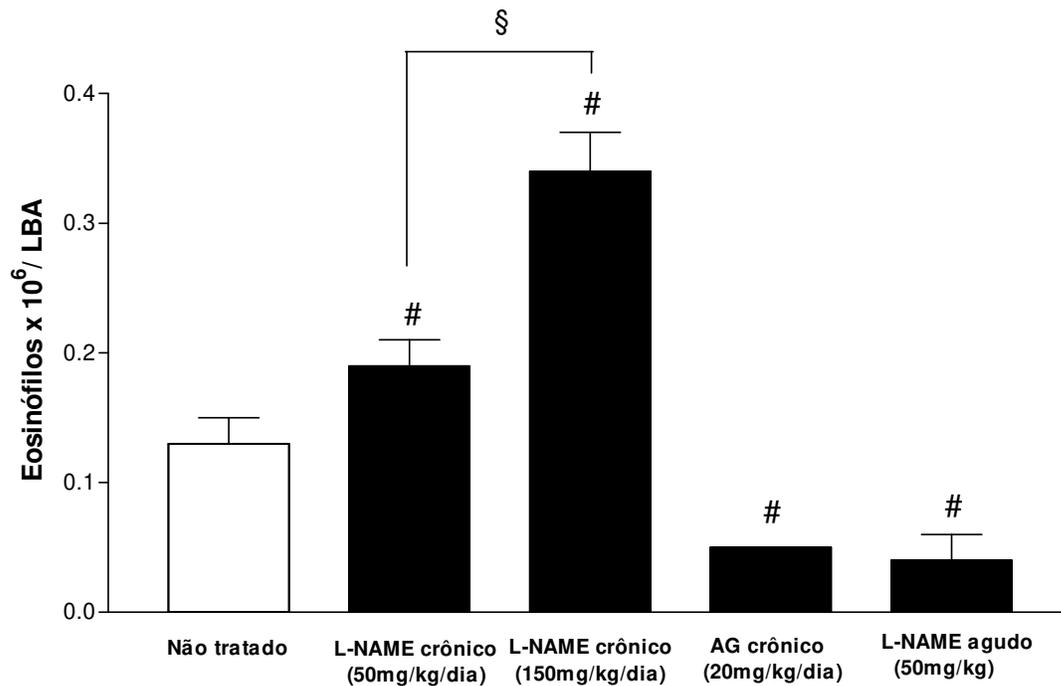
As contagens de eosinófilos no LBA, realizadas 48 h após o desafio com OVA, mostraram-se significativamente elevadas ( $0,13 \pm 0,02 \times 10^6$  células / LBA;  $P < 0,0001$ ) comparadas àquelas dos animais não-sensibilizados instilados com OVA onde não se observaram eosinófilos.

O tratamento crônico dos animais com L-NAME por três semanas, nas doses de 50 e 150 mg/kg/dia ( $n = 7$  e  $12$ , respectivamente), provocou um aumento dose-dependente ( $P < 0,001$ ) do número de eosinófilos no LBA nos camundongos desafiados com OVA quando comparados aos animais não tratados (Figura 1).

Em contraste ao tratamento crônico, o tratamento agudo com L-NAME (50 mg/kg;  $n=5$ ), administrado por gavagem 30 min antes do primeiro desafio com OVA, reduziu significativamente a infiltração de eosinófilos quando comparado ao grupo não tratado (Figura 1).

O tratamento crônico com aminoguanidina (20 mg/kg/dia; por 3 semanas;  $n=5$ ) praticamente aboliu a infiltração de eosinófilos no LBA dos animais desafiados com OVA (Figura 1).

Os tratamentos crônicos com L-NAME e aminoguanidina, bem como o tratamento agudo com L-NAME, nas doses mencionados acima, afetaram os números de leucócitos totais, de neutrófilos e de mononucleares nos camundongos sensibilizados e não-sensibilizados. O tratamento crônico com aminoguanidina aumentou o número de mononucleares e reduziu o de neutrófilos, o tratamento crônico com L-NAME (50 mg/kg/dia) reduziu o número de mononucleares enquanto o L-NAME (150 mg/kg/dia) aumentou o número de leucócitos totais, o tratamento agudo com L-NAME aumentou o número de mononucleares ( $n=5-14$ ; Tabela 1).



**Figura 1- Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME e aminoguanidina e do tratamento agudo com L-NAME sobre o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA).** Os dados foram obtidos de camundongos não tratados ou tratados com L-NAME (ou aminoguanidina), sensibilizados e desafiados com OVA (48 h). A barra branca representa os animais sensibilizados/não tratados) e as barras pretas representam os animais sensibilizados/tratados. Cada coluna representa a média ± EPM (n=5-14). #P<0,05 quando comparado com o grupo não tratado e §P<0,05 quando comparado com o grupo tratado (L-NAME crônico 50 mg/kg/dia). AG, aminoguanidina.

**Tabela 1- Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME e aminoguanidina e do tratamento agudo com L-NAME sobre o número de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA) 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). Os dados foram obtidos de camundongos controles (C) ou tratados com L-NAME ou aminoguanidina (T), não-sensibilizados (NS) ou sensibilizados (S) e desafiados com OVA (48 h). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=5-14).**

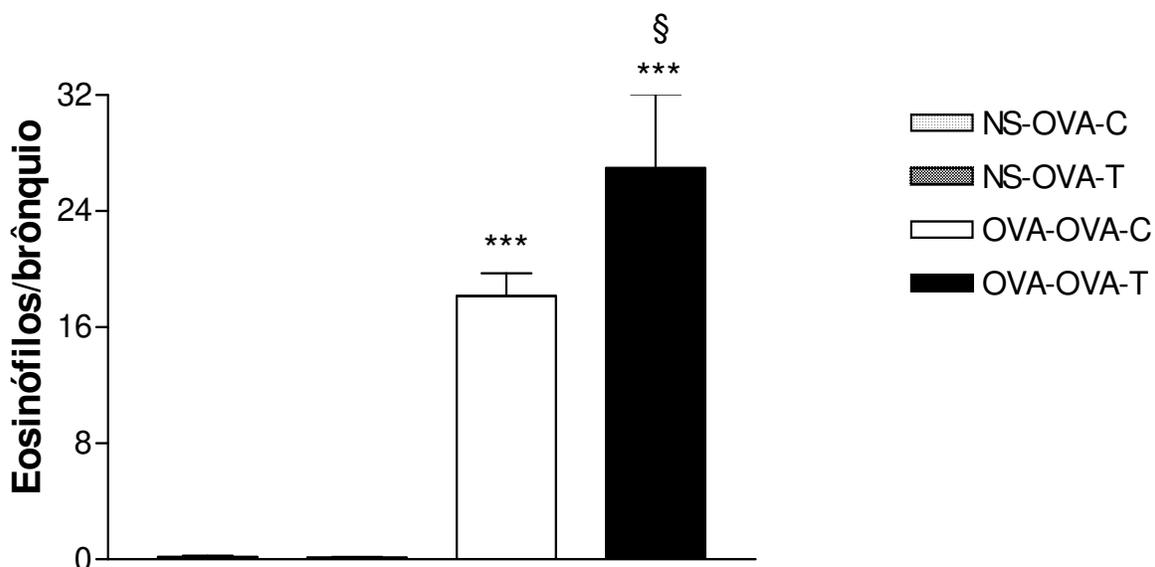
<b>Contagens total e diferencial de células no LBA</b>					
Tratamento	Grupo	n	Leucócitos totais	Mononucleares	Neutrófilos
L-NAME (50mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	7	0,41 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01
	NS-OVA-T	7	0,47 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,02
	OVA-OVA-C	7	0,46 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01
	OVA-OVA-T	7	0,52 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,02 #	0,07 $\pm$ 0,01
L-NAME (150mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	14	0,54 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,01
	NS-OVA-T	13	0,50 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01
	OVA-OVA-C	14	0,65 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,01
	OVA-OVA-T	12	0,81 $\pm$ 0,04 **	0,38 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01
Aminoguanidina (20mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	6	0,87 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,03
	NS-OVA-T	8	0,81 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01
	OVA-OVA-C	7	0,99 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,04 *	0,11 $\pm$ 0,03
	OVA-OVA-T	5	0,93 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,06 #	0,03 $\pm$ 0,01 #
L-NAME (50mg/kg/dia) Agudo	NS-OVA-C	7	0,91 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,05
	NS-OVA-T	7	1,01 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,02
	OVA-OVA-C	5	0,85 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,04
	OVA-OVA-T	5	0,95 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,04 #	0,16 $\pm$ 0,04

Não foi observado eosinófilos no LBA dos animais NS-OVA-C e NS-OVA-T.

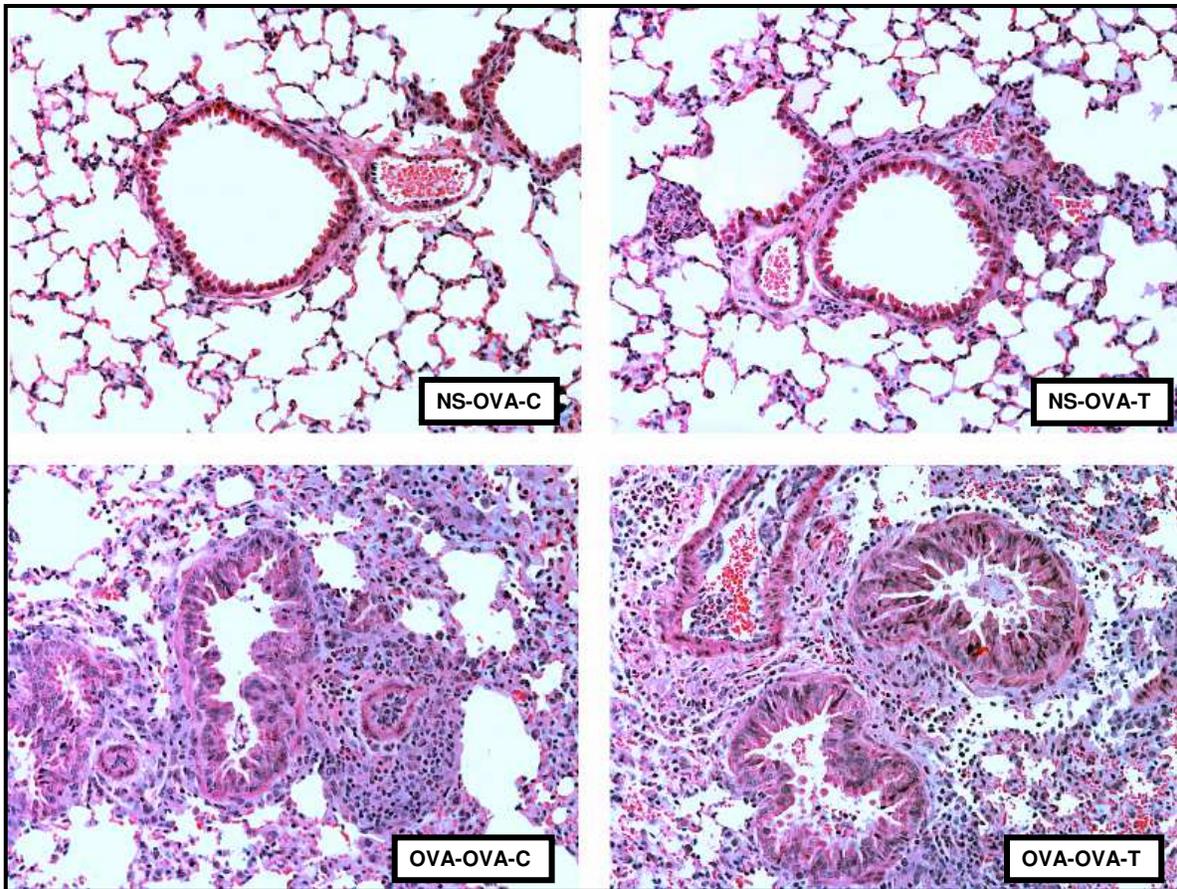
\*P<0.05 em relação aos grupos NS-OVA-C e NS-OVA-T; #P<0.05 em relação ao grupo OVA-OVA-C. n=5-14

### 3.1.2- Histologia pulmonar

O número aumentado de eosinófilos no LBA dos camundongos tratados cronicamente com L-NAME foi confirmado pela histologia pulmonar (Figuras 2 e 3). O número de eosinófilos no parênquima peribronquiolar 48 horas após o desafio com OVA mostrou-se aumentado no grupo L-NAME ( $27,0 \pm 5,1$  eosinófilos/brônquio) quando comparado ao dos animais não tratados ( $18,2 \pm 1,6$  eosinófilos/brônquio;  $n=4-5$ ). Praticamente, não houve eosinófilos nos pulmões de camundongos não sensibilizados (nem nos controles, nem nos tratados com L-NAME).



**Figura 2- Efeito do tratamento crônico com L-NAME sobre o número de eosinófilos no parênquima pulmonar após a instilação intranasal com ovalbumina (OVA).** Os dados representam o número de eosinófilos/brônquio de camundongos não tratados ou tratados com L-NAME (150 mg/kg/dia, 3 semanas), 48 h após a instilação com OVA. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM ( $n=4-5$ ). \*\*\* $P<0,001$ , quando comparados aos grupos NS-OVA-C e NS-OVA-T; e § $P<0,05$  quando comparado com o grupo OVA-OVA-C.



**Figura 3- Fotomicrografia representativa do parênquima pulmonar de camundongos Balb/c, 48 h após o desafio com ovalbumina (OVA) em animais controles e tratados cronicamente com L-NAME (150 mg/kg/dia, 3 semanas). Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não-sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Aumento de 250x.**

### 3.1.3- Sangue periférico e medula óssea

As contagens de eosinófilos em ambos, sangue periférico e medula óssea, em 48 horas após o desafio com OVA mostraram-se significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) quando comparadas aos animais não-sensibilizados instilados com OVA (Figura 4).

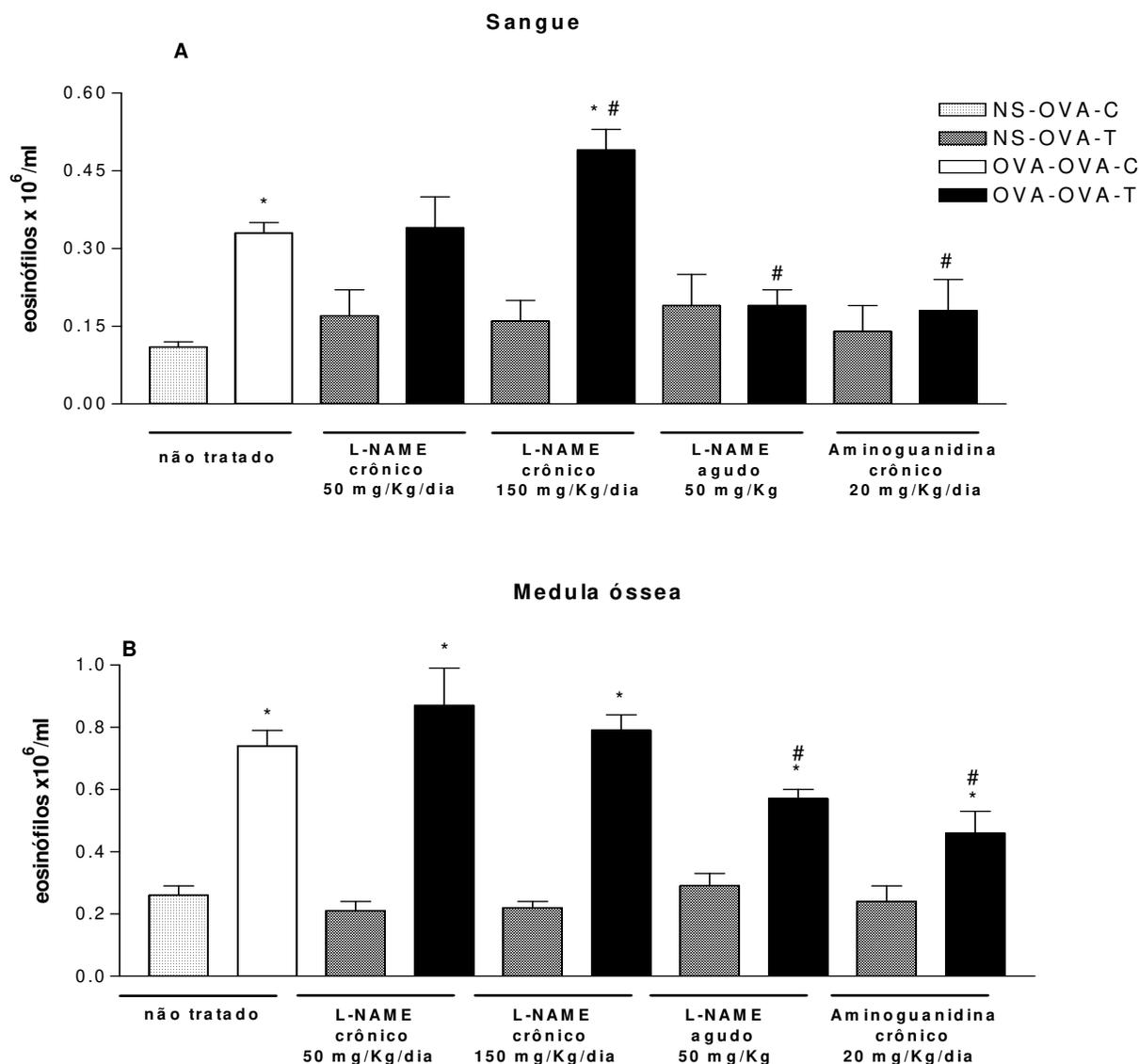
O tratamento crônico com L-NAME (50 mg/kg/dia; n=7) não modificou significativamente o número de eosinófilos no sangue periférico nos camundongos desafiados com OVA, em comparação aos animais não tratados (n=7-17; Figura 4A). Entretanto, o tratamento crônico com a dose maior de L-NAME (150 mg/kg/dia; n=15) acarretou um aumento de cerca de 50% ( $P<0,05$ ) no número de eosinófilos no sangue periférico nos camundongos desafiados com OVA.

Os tratamentos agudo com L-NAME (50 mg/kg; n=5) ou crônico com aminoguanidina (20 mg/kg/dia; n=8) reduziram significativamente as contagens de eosinófilos no sangue periférico (Figura 4A). O número de eosinófilos no sangue periférico de camundongos não sensibilizados não alterou em nenhum dos grupos estudados (Figura 4A).

O tratamento crônico com L-NAME (150 mg/kg/dia) aumentou as contagens dos leucócitos totais, dos neutrófilos e das células mononucleares, enquanto o tratamento crônico com aminoguanidina aumentou as contagens apenas dos leucócitos totais e dos neutrófilos, contrariamente os tratamentos crônico (50 mg/kg/dia) agudo com L-NAME não alteraram os números de leucócitos totais, de neutrófilos e de células mononucleares no sangue periférico (n=5-14) dos camundongos sensibilizados e não-sensibilizados (n= 5-14; Tabela 2).

Com relação à medula óssea (Figura 4B), o tratamento crônico dos animais com L-NAME (50 e 150 mg/kg/dia; n=7 e 15, respectivamente) não modificou a contagem de eosinófilos, enquanto os tratamentos agudo com L-NAME (50 mg/kg; n =5) e crônico com aminoguanidina (20 mg/kg/dia; n=8) reduziram significativamente o número de eosinófilos, em cerca de 24% e 38% respectivamente, comparando-se aos animais não tratados e desafiados com OVA. O número de eosinófilos na medula óssea dos animais não sensibilizados não sofreu alteração em nenhum dos grupos (Figura 4B).

Os tratamentos crônico (150 mg/kg/dia) e agudo com L-NAME aumentaram somente os números de neutrófilos, ao passo que os tratamentos crônicos com aminoguanidina e L-NAME (50 mg/kg/dia) não interferam com nenhuma das contagens realizadas na medula óssea dos camundongos sensibilizados e não-sensibilizados (n= 5-14; Tabela 3).



**Figura 4- Efeito dos tratamentos com L-NAME (agudo e crônico) ou aminoguanidina sobre o número de eosinófilos no sangue periférico (painel A) e medula óssea (painel B).** Os dados foram obtidos de camundongos controles ou tratados com L-NAME ou aminoguanidina, sensibilizados ou não com OVA, 48 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM (n=5-17). \*P<0,05 quando comparados aos grupo NS-OVA-C e NS-OVA-T e #P<0,05 quando comparado com o grupo OVA-OVA-C.

**Tabela 2- Efeito dos tratamentos com L-NAME (agudo e crônico) ou aminoguanidina sobre o número de eosinófilos no sangue periférico.** Os dados (n=5-17) foram obtidos de camundongos controles ou tratados com L-NAME (ou aminoguanidina), sensibilizados ou não com OVA, 48 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado).

Contagens total e diferencial de células no Sangue						
Tratamento	Grupo	n	Leucócitos totais	Mononucleares	Neutrófilos	Eosinófilos
L-NAME (50mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	7	5,75 ± 0,49	4,36 ± 0,35	1,29 ± 0,14	0,10 ± 0,02
	NS-OVA-T	7	7,56 ± 0,58	6,39 ± 0,48	1,02 ± 0,10	0,17 ± 0,05
	OVA-OVA-C	7	8,12 ± 0,74	6,13 ± 0,60	1,64 ± 0,16	
	OVA-OVA-T	7	6,64 ± 0,30	5,12 ± 0,27	1,17 ± 0,08	
L-NAME (150mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	14	5,93 ± 0,31	4,50 ± 0,20	1,33 ± 0,13	0,10 ± 0,02
	NS-OVA-T	13	6,63 ± 0,58	5,17 ± 0,52	1,31 ± 0,18	0,16 ± 0,04
	OVA-OVA-C	17	6,65 ± 0,40	5,19 ± 0,33	1,48 ± 0,08	
	OVA-OVA-T	15	9,78 ± 0,60 **	7,32 ± 0,51 **	2,00 ± 0,15 **	
Aminoguanidina (20mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	6	6,73 ± 0,41	5,21 ± 0,34	1,37 ± 0,18	0,14 ± 0,02
	NS-OVA-T	8	6,62 ± 0,42	5,12 ± 0,35	1,36 ± 0,11	0,14 ± 0,05
	OVA-OVA-C	7	8,28 ± 0,52	5,67 ± 0,41	2,14 ± 0,18	
	OVA-OVA-T	8	9,51 ± 0,38 *	6,25 ± 0,22	3,05 ± 0,26 **	
L-NAME (50mg/kg) Agudo	NS-OVA-C	6	9,36 ± 0,84	6,91 ± 0,59	2,30 ± 0,29	0,14 ± 0,04
	NS-OVA-T	7	7,64 ± 0,64	5,26 ± 0,48	2,15 ± 0,20	0,19 ± 0,06
	OVA-OVA-C	7	10,99 ± 0,66	8,11 ± 0,52	2,40 ± 0,29	
	OVA-OVA-T	5	9,34 ± 1,08	6,90 ± 0,73	2,20 ± 0,52	

\*P<0,05 em relação ao grupo NS-OVA-T; #P<0,05 em relação ao grupo OVA-OVA-C

**Tabela 3- Efeito dos tratamentos com L-NAME (agudo e crônico) ou aminoguanidina sobre o número de eosinófilos na medula óssea.** Os dados (n=5-17) foram obtidos de camundongos controles ou tratados com L-NAME ou aminoguanidina, sensibilizados ou não com OVA, 48 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado).

Contagens total e diferencial de células na Medula						
Tratamento	Grupo	n	Leucócitos totais	Mononucleares	Neutrófilos	Eosinófilos
L-NAME (50mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	7	10,59 ± 0,94	2,64 ± 0,21	3,53 ± 0,35	0,22 ± 0,04
	NS-OVA-T	7	11,01 ± 0,28	2,57 ± 0,18	4,12 ± 0,18	0,16 ± 0,03
	OVA-OVA-C	7	11,50 ± 0,76	2,51 ± 0,29	3,52 ± 0,24	
	OVA-OVA-T	7	12,71 ± 1,30	2,50 ± 0,26	3,40 ± 0,36	
L-NAME (150mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	14	11,11 ± 0,62	3,06 ± 0,19	4,24 ± 0,30	0,20 ± 0,02
	NS-OVA-T	13	10,94 ± 0,44	2,86 ± 0,19	3,94 ± 0,18	0,26 ± 0,03
	OVA-OVA-C	14	12,85 ± 0,64	2,71 ± 0,24	5,45 ± 0,38	
	OVA-OVA-T	15	13,02 ± 0,53	2,64 ± 0,29	5,30 ± 0,31 *	
Aminoguanidina (20mg/kg/dia) Crônico	NS-OVA-C	6	12,28 ± 2,52	3,24 ± 0,64	4,47 ± 0,98	0,13 ± 0,03
	NS-OVA-T	8	11,84 ± 0,40	3,67 ± 0,21	4,38 ± 0,19	0,13 ± 0,04
	OVA-OVA-C	6	13,22 ± 0,74	3,57 ± 0,28	4,71 ± 0,25	
	OVA-OVA-T	7	13,05 ± 1,13	3,38 ± 0,62	5,88 ± 0,62	
L-NAME (50mg/kg) Agudo	NS-OVA-C	6	13,25 ± 0,96	3,76 ± 0,70	1,96 ± 0,15	0,22 ± 0,05
	NS-OVA-T	7	11,81 ± 0,72	3,28 ± 0,33	2,40 ± 0,28	0,21 ± 0,04
	OVA-OVA-C	6	12,03 ± 0,46	3,23 ± 0,20	1,82 ± 0,21	
	OVA-OVA-T	5	12,04 ± 0,85	3,10 ± 0,37	3,35 ± 0,44 #	

\*P<0,05 em relação ao grupo NS-OVA-T; #P<0,05 em relação ao grupo OVA-OVA-C

### **3.2- Medida da atividade da NOS nos animais tratados com L-NAME (agudo e crônico) ou aminoguanidina**

#### 3.2.1- Atividade da NOS cerebral

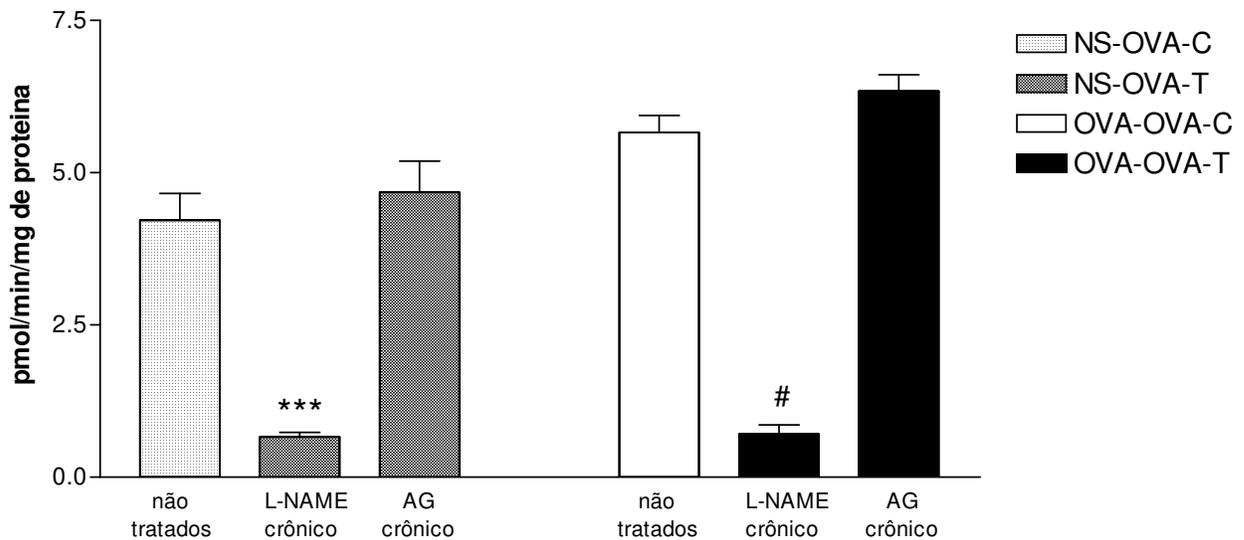
A atividade da nNOS dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cérebros de camundongos não tratados (n=5) não diferiu significativamente entre os animais não-sensibilizados e sensibilizados com OVA (n=5; Figura 5).

O tratamento crônico com L-NAME (150 mg/kg/dia; n=5) praticamente aboliu a atividade da nNOS dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em ambos os grupos, camundongos não sensibilizados e sensibilizados com OVA. Por outro lado, o tratamento crônico com aminoguanidina (20 mg/kg/dia; n=5) não modificou a atividade desta enzima em nenhum dos grupos estudados (Figura 5).

A atividade da nNOS foi também avaliada em camundongos submetidos ao tratamento agudo com L-NAME (50 mg/kg; n=5). Este tratamento reduziu significativamente a atividade da nNOS cerebral dos camundongos desafiados com OVA ( $5,8 \pm 0,4$  e  $3,6 \pm 0,2$  pmol/min/mg de proteína para o grupo controle e tratado, respectivamente;  $P < 0,05$ ).

A atividade da NOS independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (iNOS) nos cérebros mostrou-se ausente em todos os grupos estudados.

### NOS cerebral



**Figura 5- Efeito dos tratamentos com L-NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) sobre a atividade da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em homogenato cerebral.** Os dados representam a atividade da nNOS no homogenato cerebral de camundongos controles e tratados cronicamente com aminoguanidina ou L-NAME, sensibilizados ou não com OVA, 48 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*\*P<0,001 quando comparado ao grupo NS-OVA-C e #P<0,05 quando comparado com o grupo OVA-OVA-C.

### 3.2.2- Medida da atividade das óxido nítrico sintases no pulmão

A atividade da NOS independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (iNOS) no homogenato pulmonar aumentou em cerca de 35 vezes ( $P < 0,001$ ) nos animais sensibilizados com OVA ( $n=5$ ) em relação àquela dos camundongos não sensibilizados ( $n=5$ ; Figura 6).

O tratamento crônico com L-NAME (150 mg/kg/dia;  $n=5$ ) não modificou significativamente a atividade da iNOS pulmonar; entretanto, o tratamento com a aminoguanidina (20 mg/kg/dia;  $n=5$ ) praticamente aboliu o aumento da atividade da iNOS nos pulmões de camundongos sensibilizados com OVA (Figura 6).

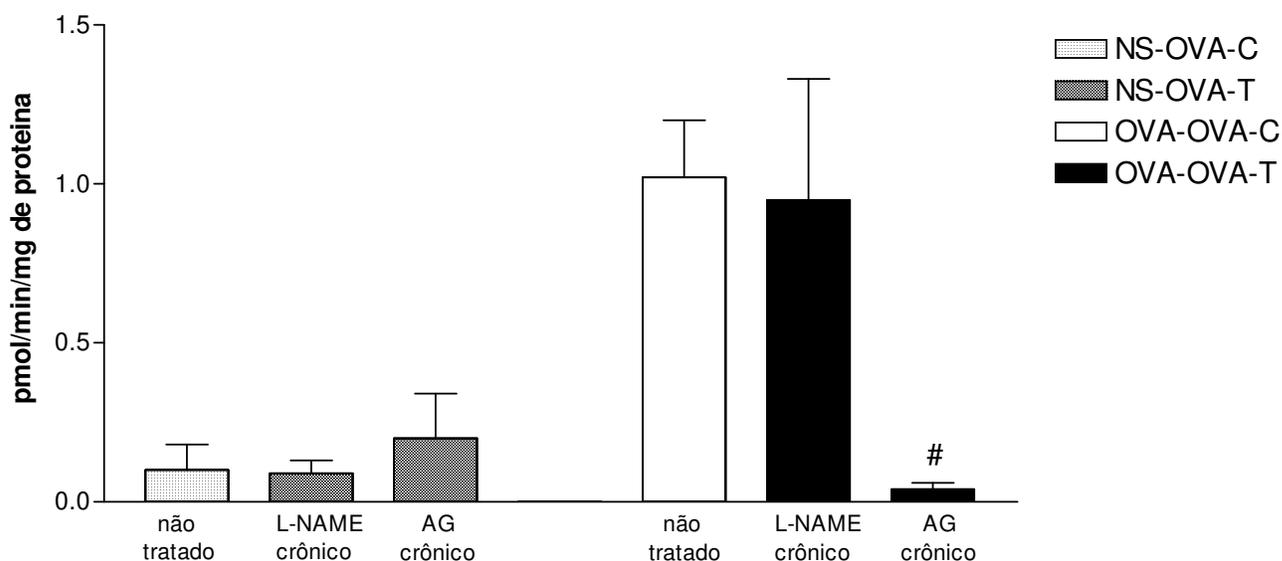
A atividade da iNOS pulmonar foi avaliada em pulmões de camundongos submetidos ao tratamento agudo com L-NAME (50 mg/kg;  $n=5$ ). Este tratamento reduziu significativamente a atividade da iNOS nos pulmões dos animais desafiados com OVA ( $1,2 \pm 0,2$  e  $0,7 \pm 0,05$  pmol/min/mg de proteína para os grupos controle e tratado, respectivamente;  $P < 0,05$ ).

Os tratamentos crônico e agudo com L-NAME, bem como o tratamento crônico com aminoguanidina não modificaram a atividade basal da iNOS nos pulmões dos camundongos não sensibilizados (Figura 6).

A atividade da NOS dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (cNOS) nos pulmões dos camundongos não-sensibilizados e sensibilizados com OVA foram também avaliados em todos os grupos. A atividade da cNOS pulmonar foi detectada nos pulmões dos animais não-sensibilizados ( $0,67 \pm 0,26$  pmol/min/mg de proteína;  $n=5$ ). Contudo, nos pulmões de animais desafiados com OVA não se detectou tal atividade ( $n=5$ ).

Nos pulmões de camundongos não-sensibilizados, a atividade da cNOS foi praticamente abolida pelos tratamentos crônico e agudo com L-NAME, mas permaneceu inalterada pelo tratamento crônico com aminoguanidina ( $0,09 \pm 0,05$  pmol/min/mg de proteína).

### iNOS pulmonar

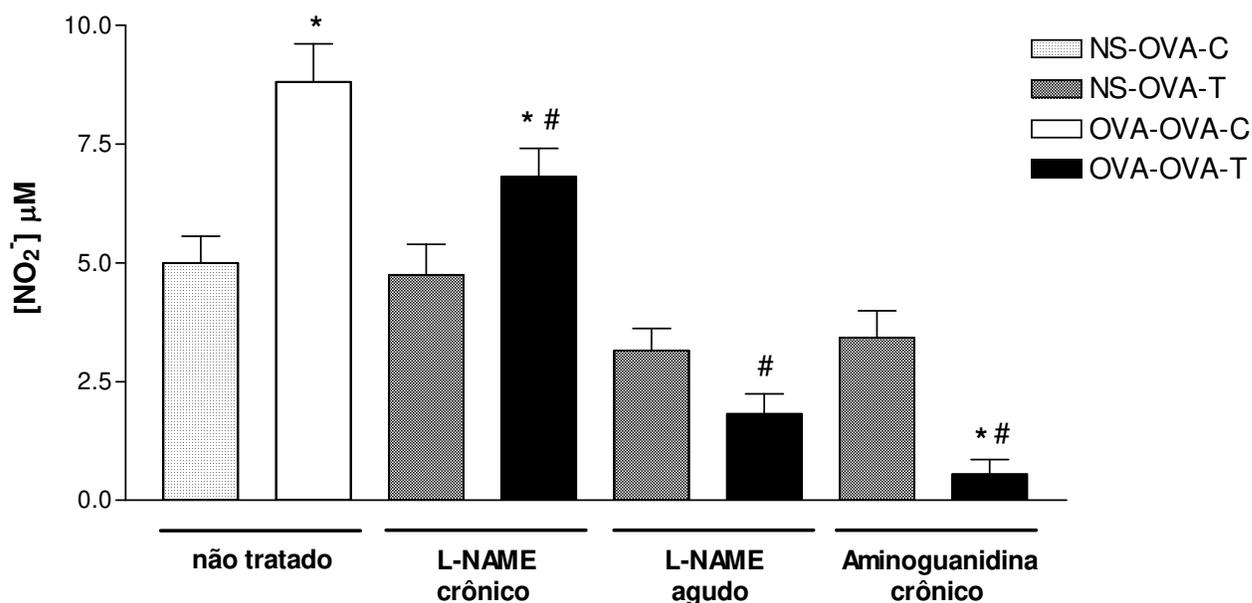


**Figura 6- Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME (150 mg/kg/dia) e com aminoguanidina (20 mg/kg/dia) sobre a atividade da iNOS no homogenato pulmonar.** Os dados representam a atividade da iNOS no homogenato pulmonar de camundongos controles (não-tratados) ou tratados cronicamente aminoguanidina (AG) ou L-NAME, sensibilizados ou não com OVA, 48 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM (n=5). #P<0,05 quando comparado com o grupo OVA-OVA-C.

### 3.3- Níveis de metabólitos do NO no LBA

Os níveis de  $\text{NO}_x$  no LBA dos camundongos desafiados com OVA (animais não tratados; n= 23) mostraram-se significativamente maiores ( $8,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ; P<0,05) em comparação aos dos animais não-sensibilizados ( $5,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ; n=17; Figura 7).

Os níveis elevados de NO<sub>x</sub> foram reduzidos em 37,5 ± 6,1 %, 68,4 ± 7,3 % e 74,9 ± 6,1 % para os tratamentos crônico com L-NAME (150 mg/kg/dia), agudo com L-NAME (50 mg/kg) e crônico com aminoguanidina (20 mg/kg/dia), respectivamente (n=5-9; Figura 7). As reduções dos níveis de NO<sub>x</sub> pelos tratamentos crônico com aminoguanidina e agudo com L-NAME foram maiores (P<0,05) se comparada àquela provocada pelo tratamento crônico com L-NAME. Estes tratamentos não afetaram os níveis de NO<sub>x</sub> nos lavados broncoalveolares dos animais não-sensibilizados.



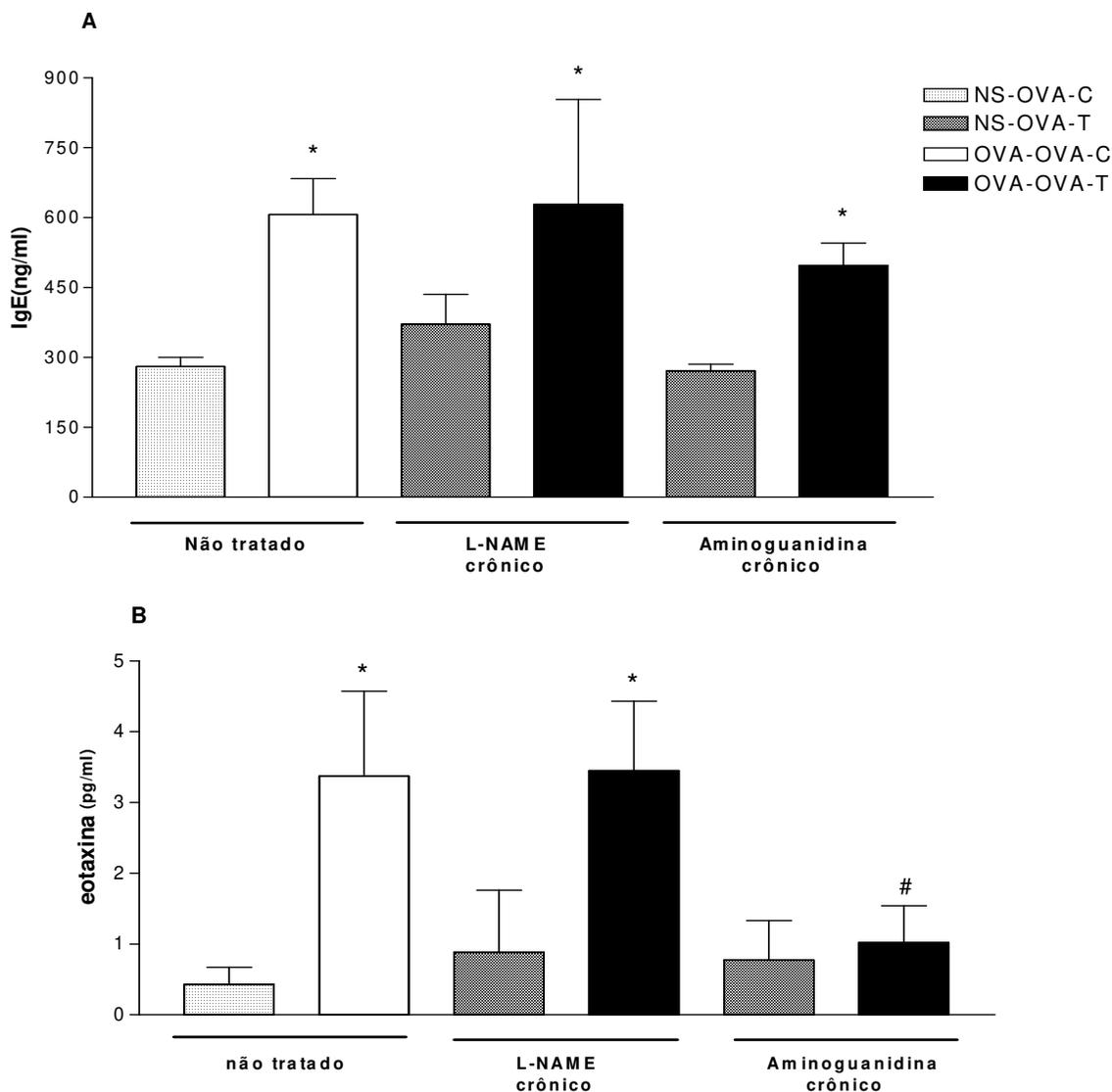
**Figura 7- Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME (150 mg/kg/dia) e com aminoguanidina (20 mg/kg/dia) e do tratamento agudo com L-NAME (50 mg/kg) sobre os níveis dos NO<sub>x</sub> no lavado broncoalveolar.** Os dados foram obtidos de camundongos não-sensibilizados ou sensibilizados, 48 h após a instilação com OVA. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Cada coluna representa a média ± EPM (n=5-23). \*P<0,05 quando comparado aos grupo NS-OVA-C, NS-OVA-T, e #P<0,05 comparado ao grupo OVA-OVA-C.

### **3.4- Níveis séricos de IgE e eotaxina no lavado broncoalveolar**

Os níveis séricos de IgE mostraram-se significativamente aumentados no soro de camundongos sensibilizados com OVA quando comparados aos dos animais não-sensibilizados, como esperado ( $P < 0,001$ ). Todavia, os tratamentos crônicos com L-NAME (150 mg/kg/dia; n=5) ou aminoguanidina (20 mg/kg/dia; n=6) não afetaram os níveis de IgE nos animais não sensibilizados (n= 10) e sensibilizados com OVA (n= 5-8; Figura 8A).

Os níveis de eotaxina aumentaram significativamente no LBA dos camundongos desafiados com OVA (n=5) em comparação aos dos animais não-sensibilizados (n=5). O tratamento crônico com L-NAME (150 mg/kg/dia, durante 3 semanas; n=5) não modificou significativamente os níveis elevados de eotaxina no LBA dos animais desafiados com OVA. Em contraste, o tratamento com aminoguanidina (20 mg/kg/dia; n=5) praticamente aboliu os níveis elevados de eotaxina no LBA dos animais desafiados com OVA, trazendo-os próximos aos níveis basais, observados nos animais não-sensibilizados (Fig. 8B).

Os níveis de IL-5 mostraram-se abaixo do limite de detecção no soro e no LBA de todos os grupos ( $< 7$  pg/mL).



**Figura 8-** Efeito dos tratamentos crônicos com L-NAME (150 mg/kg/dia) e aminoguanidina (20 mg/kg/dia) sobre os níveis de IgE no soro e de eotaxina no lavado broncoalveolar. Os dados representam os níveis de IgE (painel A) e de eotaxina (painel B) de camundongos controles (não-tratados) ou tratados cronicamente com aminoguanidina e L-NAME, 48 h após a instilação com OVA. Os grupos experimentais foram: NS-OVA-C (não-sensibilizado/não tratado), NS-OVA-T (não sensibilizado/tratado), OVA-OVA-C (sensibilizado/não tratado) e OVA-OVA-T (sensibilizado/tratado). Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM (n=5-10). \*P<0,05 quando comparado aos grupos NS-OVA-C e NS-OVA-T, e #P<0,05 quando comparado ao grupo OVA-OVA-C.

### 3.5- Estudo farmacocinético: Determinação do L-NAME e N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina no soro

Inicialmente, o L-NAME (30-300 ng/ml) e o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (30-300 ng/ml) foram incubados com o soro de camundongos *in vitro*, ao fim do qual analisou-se as concentrações destas substâncias.

A tabela 4 mostra que o L-NAME e o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina mantêm-se intactos no soro, pois quantidades semelhantes destas substâncias foram encontradas no eluato em relação ao analito, indicando que a simples incubação no soro não leva à hidrólise das mesmas.

**Tabela 4-** Resultado das análises em cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa

Analito	Valor nominal		
	30 ng/mL	150 ng/mL	300 ng/mL
N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina	31,42 ± 0,24	150,07 ± 3,20	291,96 ± 1,81
L-NAME	31,98 ± 0,90	141,54 ± 9,21	293,74 ± 5,65

Em seguida, passamos a analisar a concentração de L-NAME e de N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina no soro dos animais tratados com L-NAME, aguda e cronicamente (50 mg/kg e 150 mg/kg/dia por 3 semanas, respectivamente). Para este estudo, que requer quantidades relativamente grandes de soro, fizemos um *pool* do soro de 5 camundongos de cada grupo.

Nossos resultados mostraram inexistência de L-NAME no soro dos animais tratados aguda ou cronicamente com L-NAME.

No grupo que recebeu o tratamento agudo com L-NAME, os níveis séricos do metabólito N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina foram avaliados em 0,5, 1, 2, 3 e 24 h após a ingestão da droga. Notamos uma diminuição tempo-dependente dos níveis deste metabólito (72,0; 53,9; 31,8; 38,6 e 32,1 ng/mL para 0,5, 1, 2, 3 e 24 horas, respectivamente).

No grupo que recebeu o tratamento crônico com L-NAME, os níveis séricos do metabólito N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina mostraram-se muito baixos (16,2 ng/mL), pouco acima do limite de detecção (10 ng/ml).

## **4- DISCUSSÃO**

O presente estudo, realizado em camundongos BALB/c, mostrou que o L-NAME, inibidor não seletivo da NOS, pode tanto inibir quanto potencializar o influxo de eosinófilos para o LBA de animais desafiados com OVA, dependendo se este inibidor foi administrado aguda ou cronicamente aos animais. Nossos dados também mostraram que o tratamento agudo com L-NAME inibiu significativamente as atividades de ambas isoformas, cNOS e iNOS em cérebro e pulmão, ao passo que o tratamento crônico com L-NAME praticamente aboliu a atividade da cNOS, sem interferir com a atividade da iNOS pulmonar. A aminoguanidina, como esperado, inibiu significativamente a atividade da iNOS nos pulmões, sem modificar a atividade da cNOS cerebral. Os dados de farmacocinética mostraram que as concentrações séricas de N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina dos camundongos que receberam ingestão aguda de L-NAME foram maiores do que aquelas oriundas dos animais que receberam ingestão crônica de L-NAME. Portanto, considerando que o NO possui efeitos protetores ou patológicos (Folkerts and Nijkamp, 2006; Mathrani et al., 2007), nossos dados sugerem fortemente que a potenciação do influxo de eosinófilos pelo tratamento crônico com L-NAME em camundongos desafiados com OVA reflete essencialmente a remoção do NO protetor derivado da cNOS pulmonar, não interferindo no agravamento da inflamação pulmonar causado pelo NO derivado da iNOS.

É bem estabelecido que o desafio de animais com antígenos como a OVA induz um aumento significativo de eosinófilos no LBA e no tecido pulmonar, que é usualmente observado entre 24 e 48 horas após o desafio, dependendo, principalmente, da via usada para o desafio alérgico (intratraqueal, aerosol ou instilação nasal), e a espécie e/ou linhagem animal (Sanjar et al., 1990; Matsumoto et al., 1994; Vianna and Garcia-Leme, 1995; Mathrani et al., 2007). O tratamento de camundongos, de ratos e de cobaias com L-NAME reduz significativamente o número de eosinófilos no LBA e no tecido pulmonar, que é consistente com o conceito de que o NO desempenha um papel importante na infiltração de eosinófilos para as vias aéreas de animais sensibilizados e desafiados (Feder et al., 1997; Ferreira et al., 1998; Iijima et al., 1998). Contudo, em relação ao isotipo da NOS responsável pela infiltração de eosinófilos, a literatura é ainda bastante controversa. Um estudo prévio mostrou que o número elevado de eosinófilos pulmonares, observado após a exposição de camundongos ao aerosol de OVA, estava marcadamente reduzido em animais deficientes da iNOS (Xiong et al., 1999). Aumento na imunomarcaç

e na atividade para iNOS também foram observados em camundongos desafiados com OVA (Trifilieff et al., 2000). Similarmente, os inibidores seletivos para a iNOS, 1400W (Iijima et al., 2001) e a aminoguanidina (Landgraf et al., 2005) reduziram o número de eosinófilos no LBA de camundongos desafiados com OVA. O inibidor da iNOS, SC-51, também reduziu a quantidade da proteína básica principal (MBP), marcador de eosinófilos, em ratos Brown-Norway desafiados com OVA (Eynott et al., 2003). Em contraste a todos esses estudos, o desafio com OVA em camundongos sensibilizados não modificou nem a expressão protéica de iNOS (ou RNAm para a iNOS) nos pulmões, nem os níveis de nitrito no LBA (Feder et al., 1997). Igualmente, o inibidor da iNOS, 1400W, não modificou o influxo de eosinófilos para as vias aéreas de animais sensibilizados com OVA (Feder et al., 1997; Muijsers et al., 2001; Birrell et al., 2003). Além disso, o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas induzido pela OVA não foi modificado em camundongos deficientes de iNOS em comparação aos animais selvagens (Koarai et al., 2002; Landgraf et al., 2005). No geral, estes estudos mostram claramente que o NO está envolvido no desenvolvimento da eosinofilia pulmonar em animais alérgicos; porém, a fonte de NO nas vias aéreas ainda é questionável.

Em nosso estudo, o L-NAME, administrado de forma aguda aos camundongos, reduziu significativamente o número de eosinófilos no LBA dos animais desafiados com OVA, que foi acompanhada por reduções significativas nas atividades da iNOS pulmonar e da cNOS cerebral, bem como por redução marcante nos níveis de NO<sub>x</sub> no LBA. Adicionalmente, o tratamento dos camundongos com aminoguanidina, inibidor seletivo da iNOS, praticamente aboliu o influxo de eosinófilos para o LBA dos animais desafiados com OVA. Este efeito foi acompanhado por redução marcante dos níveis de NO<sub>x</sub> no LBA, bem como redução expressiva da atividade da iNOS pulmonar (sem afetar a atividade da cNOS cerebral). Nossos dados são, portanto, consistentes com estudos prévios mostrando que o NO derivado da iNOS está amplamente envolvido na modulação do influxo de eosinófilos para as vias aéreas de animais desafiados com alérgenos. Intrigante, contudo, foi o fato de o L-NAME, dado crônicamente por três semanas, potencializar o influxo eosinofílico pulmonar nos camundongos desafiados com OVA. Considerando-se que o tratamento crônico não afetou a atividade da iNOS no homogenato pulmonar (a despeito da redução marcante da atividade da cNOS tanto no cérebro quanto no pulmão) e causou redução bem

menor dos níveis de NO<sub>x</sub> no LBA, é muito provável que a potenciação do influxo de eosinófilos pelo tratamento crônico com L-NAME seja consequência da remoção do NO protetor derivado da cNOS, mantendo intacto o NO patológico oriundo da iNOS. Supõe-se, portanto, que o L-NAME, administrado cronicamente aos camundongos BALB/c, iniba preferencialmente a isoforma cNOS.

Os eosinófilos são derivados de precursores mielóides na medula óssea, e em resposta à ativação por determinadas citocinas são liberados na circulação e recrutados para os tecidos de indivíduos alérgicos (Denburg et al., 2000). O desafio antigênico em indivíduos alérgicos pode também ativar uma resposta sistêmica que aumenta a produção celular na medula óssea (Wood et al., 1998). Em nosso estudo, detectamos um número elevado de eosinófilos no sangue periférico de camundongos desafiados com OVA. O número de eosinófilos na medula óssea também mostrou-se significativamente elevado 48 horas após o desafio antigênico, que, acreditamos, reflete uma diferenciação contínua de células inflamatórias na medula óssea em resposta a OVA. Isto está de acordo com estudos prévios em camundongos sensibilizados com OVA (Chin et al., 1998) e indivíduos asmáticos expostos à inalação antigênica (Wood et al., 1998). Em nosso estudo, a redução da contagem de eosinófilos na medula óssea e no sangue periférico foi observado em camundongos que receberam tratamento agudo com L-NAME (ou crônico com aminoguanidina), paralelo à atenuação da infiltração de eosinófilos nos pulmões dos animais desafiados com OVA. Contrariamente, um aumento na contagem de eosinófilos no sangue periférico foi observado nos camundongos tratados cronicamente com L-NAME e desafiados com OVA, que também é consistente com o aumento do influxo de eosinófilos para os pulmões destes animais. A ineficácia do tratamento crônico com L-NAME em alterar o número de eosinófilos na medula óssea não nos é clara, mas talvez seja reflexo de uma emigração acelerada destas células da medula óssea para a circulação sanguínea a fim de alcançar os pulmões 48 horas após o desafio com OVA.

Na asma alérgica, as imunoglobulinas do isotipo IgE específicas para antígeno estão envolvidas na reação inflamatória das vias aéreas. A sensibilização de diferentes espécies animais com OVA estimula uma inflamação alérgica mediada pela IgE (Kung et al., 1994; Feder et al., 1997; Ferreira et al., 1998). Em nosso estudo, elevados

níveis séricos de IgE foram detectados em camundongos desafiados com OVA comparados aos animais não-sensibilizados, como esperado. Contudo, os níveis elevados de IgE em animais desafiados com OVA não mudaram pelo tratamento crônico com L-NAME, excluindo a possibilidade de que a potencialização do influxo de eosinófilos no LBA reflita mecanismos envolvendo acúmulo de células via resposta anafilática mediada por IgE.

A subfamília das CC-quimiocinas, incluindo a eotaxina (CCL11), a eotaxina-2 (CCL24) e a eotaxina-3 (CCL26), desempenha importantes funções na atração de eosinófilos para os focos inflamatórios (Shahabuddin et al., 2000; Teran, 2000; Kaplan, 2001), através de ativação do receptor CCR-3 (Tachimoto et al., 2002). Consistente com isso, níveis elevados de eotaxina foram detectados no soro, plasma e/ou escarro de pacientes asmáticos e de animais desafiados com antígeno (Jahnz-Rózyk et al., 2000; Tateno et al., 2004; Yamamoto et al., 2003; Li et al., 2005). Além disso, a eotaxina e a IL-5 (um mediador crucial envolvido nas funções eosinofílicas) parecem agir cooperativamente para promoverem seletiva e sinergicamente o recrutamento de eosinófilos para os tecidos (Mould et al., 1997; Palframan et al., 1998). O sinergismo entre estas duas citocinas envolve a habilidade da eotaxina em recrutar seletivamente eosinófilos para os tecidos e da IL-5 na ativação destas mesmas células, ampliando assim a resposta à eotaxina (Lamkhieued et al., 1997). Em nossos estudos, elevados níveis de eotaxina foram encontrados no LBA de camundongos desafiados com OVA comparados aqueles aos animais não-sensibilizados; além disso, estes níveis elevados de eotaxina foram suprimidos pelo tratamento crônico com aminoguanidina. Porém, o tratamento crônico com L-NAME não modificou os níveis elevados de eotaxina nos animais desafiados com OVA, indicando que a potenciação do influxo de eosinófilos no LBA não reflete produção exacerbada desta citocina. Os níveis de IL-5 não foram detectados nem no LBA nem no soro dos animais de nenhum de nossos grupos experimentais. De fato, parece haver uma grande dificuldade na medida da IL-5 em animais e em humanos, que pode ser devido à sensibilidade do ELISA para concentrações diminutas, não esquecendo que a IL-5 sérica está elevada, principalmente, logo após o desafio alergênico e durante as exacerbações da doença (Braunstahl et al., 2001). Todavia, uma baixa concentração de IL-5 no soro é aparentemente suficiente para ativar os eosinófilos em pacientes alérgicos.

Os avanços na compreensão do papel do NO na modulação das doenças alérgicas pulmonares foram alcançados, em grande parte, graças à utilização dos inibidores da NOS, particularmente o L-NAME. Nossos achados que a administração de L-NAME aos camundongos BALB/c por três semanas causa inibição preferencial da atividade da cNOS, não afetando significativamente a iNOS pulmonar, levou-nos a hipotetizar que essas diferenças estariam relacionadas ao perfil farmacocinético de tal composto, quando administrado aguda ou cronicamente. É surpreendente, contudo, a inexistência de estudos procurando avaliar a biodisponibilidade do L-NAME após sua administração aguda ou crônica. Desta maneira, as concentrações séricas do L-NAME e de seu metabólito N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina foram medidas em ambos os grupos. Nossos dados mostraram que o L-NAME *per se* não foi detectado no soro de nenhum dos grupos estudados, indicando que a porção metil éster deste composto é removida eficientemente durante o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, liberando a N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina na circulação sistêmica. Isto indica que o L-NAME *per se* não é biodisponível quando administrado por via oral, ao menos em camundongos BALB/c. Por outro lado, detectou-se a N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina no soro dos camundongos após a ingestão de L-NAME, demonstrando que esse metabólito é responsável pela inibição da NOS *in vivo*, quando ministrado via oral aguda ou cronicamente. Os níveis séricos do N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina nos animais que receberam L-NAME por gavagem (50 mg/kg) alcançaram a concentração de 72 ng/mL em 30 min, decaindo para a metade após 2 horas da administração, mantendo tais níveis elevados por até 24 horas. Em contraste, os níveis séricos do N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina nos animais que receberam L-NAME cronicamente (150 mg/kg/dia, por 3 semanas) alcançaram concentrações muito baixas (16,2 ng/mL) que estavam próximas do limite de detecção do método (10 ng/mL). É provável, portanto, que a manutenção de baixas concentrações do N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina na circulação sistêmica aja inibindo preferencialmente a atividade da isoforma cNOS, ao passo que concentrações mais elevadas deste metabólito sejam necessárias para inibir a atividade da iNOS.

Um estudo prévio comparou o L-NAME e o N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina quanto à inibição *in vitro* da atividade da cNOS no leito coronariano e no cérebro de ratos, assim como quantificou os níveis destas duas substâncias em tampão biológico, plasma e sangue (Pfeiffer et al., 1996). Os resultados destes autores mostraram que o L-NAME produziu

aumento significativo da pressão de perfusão do leito coronariano (vasoconstrição) o qual foi acompanhado do aparecimento de N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina no efluente coronariano (Pfeiffer et al., 1996). Em cérebro purificado de ratos, o L-NAME foi cerca de 50 vezes menos potente do que o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina quanto à capacidade de inibição da cNOS. Entretanto, na presença de pH neutro ou alcalino, o L-NAME adquiria a mesma capacidade inibitória da cNOS em relação ao N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina. No geral, a inibição da cNOS foi proporcional à formação de N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina, sugerindo aos autores que o L-NAME é uma pró-droga que, *per se*, é destituída de atividade inibitória sobre a cNOS, a menos que seja hidrolisado para N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina. Demonstrou-se ainda que essa hidrólise ocorre moderadamente em tampões fisiológicos, mas é grandemente acelerada no sangue e endotélio vascular (Pfeiffer et al., 1996). Diferentemente deste estudo, em nossas mãos, o L-NAME não sofreu hidrólise *in vitro* em soro de camundongos. Isto nos sugere que o L-NAME é hidrolisado pelo sistema de primeira-passage hepático, mas não por enzimas plasmáticas.

Em conclusão, nosso estudo mostra que a administração diária de L-NAME por três semanas inibe preferencialmente a atividade da cNOS sem afetar significativamente a atividade da iNOS pulmonar, causando, conseqüentemente, um aumento do influxo de eosinófilos para os pulmões de camundongos desafiados com OVA. Contrariamente, a administração aguda de L-NAME inibe ambas as isoformas da NOS (cNOS e iNOS) levando a inibição do influxo eosinofílico pulmonar. Estas diferenças funcionais entre os tratamentos agudo e crônico com L-NAME são, provavelmente, reflexos do perfil farmacocinético de tal composto, quando administrado aguda ou cronicamente. Sabendo-se que inibidores seletivos para cNOS apresentam grandes limitações para serem testados *in vivo*, o presente modelo de oferta de L-NAME na água de beber por períodos prolongados de tempo a camundongos BALB/c pode ser adequado quando o propósito é produzir inibição preferencial da atividade da cNOS.

## **5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615.

Arts JHE, Kuper CF. Animal models to test respiratory allergy of low molecular weight chemicals: A guidance. *Methods* 2006; 41:61-71.

Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16:128-130.

Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 2006; 27:413-26.

Birrell MA, McCluskie K, Haddad El-Bdaoui, Battram CH, Webber SE, Foster ML, Yacoub MH, Belvisi MG. Pharmacological Assessment of the Nitric-Oxide Synthase Isoform Involved in Eosinophilic Inflammation in a Rat Model of Sephadex-Induced Airway Inflammation. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 304:1285-1291.

Bochner BS, Busse WW. Allergy and asthma. *J allergy Clin Immunol* 2005; 115:953-9.

Bove PF, van der Vliet A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 41:515-527.

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; 72:248-254.

Braman SS. The Global Burden of Asthma. *Chest* 2006; 130:4S-12S.

Braunstahl GJ, Overbeek SE, KleinJan A, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(3):469-76.

Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th<sub>2</sub> responses in the absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol* 1999; 163:6448-54.

Broide DH, Hoffman H, Sriramarao P. Genes that regulate eosinophilic inflammation. *Am J Hum Genet*; 1999; 65(2):302-307.

Broide DH, Sriramarao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunological Reviews* 2001; 179:163-172.

Buck CA. Immunoglobulin superfamily: structure, function and relationship to other receptor molecules. *Seminars in cell biology* 1992; 3(3):179-88.

Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5):350-362.

Chin JE, Winterrowd GE, Hatfield CA, Brashler JR, Griffin RL, Vonderfecht SL, Kolbasa KP, Fidler SF, Shull KL, Krzesicki RF, Ready KA, Dunn CJ, Sly LM, Staite ND, Richards IM. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in the antigen-induced infiltration of eosinophils and lymphocytes into the airways in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(2):158-67.

Choi JY, Hoffman LA, Rodway GW, Sethi JM. Markers of Lung Disease in Exhaled Breath: Nitric Oxide. *Biological Research for Nursing* 2006; 7:241-255.

Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:551-559.

Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J. Exp. Med.* 1995; 182:1169-74.

Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, Rodriguez A, Alcântara-Neves NM, Genser B, Pontes de Carvalho L, Stein RT, Cruz AA, Rodrigues LC, Barreto ML. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulm Med* 2006; 6:24

Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13:501-506.

Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotna A, Springer MS. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med*; 1996; 183(5):2349-2354.

Denburg JA, Sehmi R, Saito H, Pil-Seob J, Inman MD, O`Byrne PM. Systemic aspects of allergic disease: bone marrow responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5 Suppl):S242-6.

Dietrich WF, Miller J, Steen R et al.. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 1996; 380:149-52.

Donnelly LE, Barnes PJ. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:144-151.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39(4):343-350.

Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006; 355:2226-235.

Egan RW, Athwahl D, Chou CC, Emtage S, Jehn C-H, Kung TT, Mauser PJ, Murgolo NJ, Bodmer MW. Inhibition of pulmonary eosinophilia and hyperreactivity by antibodies to interleukin-5. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:321-322.

Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis asthma. *J Clin Invest* 2003; 111:291-7.

Eriksson U, Egermann U, Bihl MP et al.. Human bronchial epithelium controls responses by Th<sub>1</sub>-induced, nitric oxide-mediated STAT5 dephosphorylation: implications for the pathogenesis of asthma. *J Immunol* 2005; 175:2715-20.

Eynott PR, Groneberg DA, Caramori G, Adcock IM, Donnelly LE, S. Kharitonov S, Barnes PJ, Chung KF. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol* 2002; 452:123-133.

Eynott PR, Paavolainen N, Groneberg DA, Noble A, Salmon M, Nath P, Leung S-Y, Fan Chung K. Role of Nitric Oxide in Chronic Allergen-Induced Airway Cell Proliferation and Inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304:22-29.

Feder LS, Stelts D, Chapman RW, Manfra D, Crawley Y, Jones H, Minnicozzi M, Fernandez X, Paster T, Egan W, Kreutner W, Kung TT. Role of Nitric Oxide on Eosinophilic Lung Inflammation in Allergic Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:436-442.

Ferreira HHA, Medeiros MV, Lima CSP, Flores CA, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 1996; 310:201-207.

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

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

Ferreira HHA, Conran N, Antunes E. Modulation of Eosinophil Functions by Nitric Oxide: Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 2006; 5:1-13.

Fischer A, Folkerts G, Geppetti P, Groneberg DA. Mediators of Asthma: Nitric Oxide. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2002; 15:73-81.

Folkerts G, Nijkamp FP. Nitric oxide in asthma therapy. *Curr Pharm Des* 2006; 12(25): 3221-32.

Foster PS, Hogan S, Ramsay A, Matthaei K, Young I. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 1996; 183:195-201.

Foster PS. STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:12-16.

Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168:727-732.

Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1251-3.

Gaspar Elsas MI, Joseph D, Xavier Elsas P, Vargaftig BB. Rapid increase in bone marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1997; 17:404-413.

Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm Rev* 1999; 51: 213-339.

Giembycz MA. Are eosinophils out of asthma? *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:61-62.

Gleich GJ, Loegering DA. Immunobiology of Eosinophils. *Annual Review of Immunology* 1984; 2:429-459.

Global Initiative for Asthma. GINA workshop report: global strategy for asthma management and prevention. Available from: [http://www.ginasthma.com/wr\\_clean.pdf](http://www.ginasthma.com/wr_clean.pdf). 2004.

Gonzalo J-A., Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez A-C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188:157-167.

Hjoberg J, Shore S, Kobzik L, Okinaga S, Hallock A, Vallone J, Subramanian V, De Sanctis GT, Elias JA, Drazen JM, Silverman ES. Expression of nitric oxide synthase-2 in the lungs decreases airway resistance and responsiveness. *J Appl Physiol* 2004; 97: 249-259.

Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical & Experimental Allergy* 2008; 38(5):709–750.

Howat WJ, Holgate ST, Lackie PM. TGF- $\beta$  isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol* 2002; 282:L115-23.

Iijima H, Uchida Y, Endo T, Xiang A, Shirato M, Nomura A, Hasegawa S. Role of endogenous nitric oxide in allergen-induced airway responses in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 1998; 124:1019-1024.

Iijima H, Duguet A, Eum S-Y, Hamid Q, Eidelman DH. Nitric Oxide and Protein Nitration are Eosinophil Dependent in Allergen-Challenged Mice. *Am Respir Crit Care Med* 2001; 163:1233-1240.

Iijima H, Tulic MK, Duguet A, Shan J, Carbonara P, Hamid Q, Eidelman DH. NOS 1 is required for allergen-induced expression of NOS 2 in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138:40-50.

Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1313-20.

Jahnz-Rózyk K, Plusa T, Mierzejewska J. Eotaxin in serum of patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: relationship with eosinophil cationic protein and lung function. *Mediators Inflamm* 2000; 9:175-9.

Kaplan AP. Chemokines, chemokine receptors and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(4):423-31.

Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 5:555-68.

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ et al.. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003; 22:374-82.

Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock AA, Kerstjens HÁ et al. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167:1655-59.

Koarai A, Ichinose M, Sugiura H, Tomaki M, Watanabe M, Yamagata S, Komaki Y, Shirato K, Hattori T. iNOS depletion completely diminishes reactive nitrogen-species formation after an allergic response. *Eur Respir J* 2002; 20:609-616.

Kobayashi K, Nishimura Y, Yamashita T, Nishiuma T, Satouchi M, Yokoyama M. The effect of overexpression of endothelial nitric oxide synthase on eosinophilic lung inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology* 2006; 6:1040-1052.

Kroegel C, Virchow JC, Walker C. Asthma. *New Engl J Med* 1993; 328:1639-1640.

Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Watnick AS, Jones H, Mauser PJ, Fernandez X, Umland S, Kreutner W, Chapman RW, Egan RW. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94:1217-1224.

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

Landgraf RG, Russo M, Jancar S. Acute inhibition of inducible nitric oxide synthase but not its absence suppresses asthma-like responses. *European Journal of Pharmacology* 2005; 518:212-220.

Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes, Garcia–Zapata EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg RD, Luster AD, Hamid Q. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol* 1997; 159(9):4593-601.

Levy JH. The Human Inflammatory Response. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1996; 27 Suppl 1:S31-7.

Li J, Saito H, Crawford L, Inman MD, Cyr MM, Denburg JA. Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology* 2005; 114(3): 386-96.

Li L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L, Mosmann TR, Lo D. Effects of Th2 Cytokines on Chemokine Expression in the Lung: IL-13 Potently Induces Eotaxin Expression by Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 1999; 162:2477-2487.

Lintomen L, Gaspar Elsas MIC, Maximiano ES, Paula Neto HA, Joseph D, Vargaftig BB, Elsas XP. Allergic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Br J Pharmacol* 2002; 135:1315-1323.

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.

Mathrani VC, Kenyon NJ, Zeki A, Last JA. Mouse models of asthma: can they give us mechanistic insights into the role of nitric oxide? *Curr Med Chem* 2007; 14(20):2204-13.

Matsumoto T, Ashida Y, Tsukuda R. Pharmacological modulation of immediate and late airway response and leukocyte infiltration in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269(3):1236-44.

McFadden ER. Asthma. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13th ed. New York: McGraw-Hill; 1994. p.1167-1172.

Ministério da Saúde, 2000. (arquivo capturado em junho de 2007).

Moncada S, Higgs A. The L- arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.

Montefort S, Holgate ST, Howarth PH. Leucocyte-endothelial adhesion molecules and their role in bronchial asthma and allergic rhinitis. *Eur Respir J*. 1993; 6(7):1044.

Mould AW, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between Interleukin-5 and Eotaxin in Regulating Blood and Tissue Eosinophilia in Mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:1064-1071.

Mould AW, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG, Rothenberg ME, Foster PS.

The Effect of IL-5 and Eotaxin Expression in the Lung on Eosinophil Trafficking and Degranulation and the Induction of Bronchial Hyperreactivity. *The Journal of Immunology* 2000; 164:2142-2150.

Muijsers RBR, ten Hacken NHT, Van Ark I, Folkerts G, Nijkamp FP, Postma DS. L-Arginine is not the limiting factor for nitric oxide synthesis by human alveolar macrophages in vitro. *Eur Respir J* 2001; 18:667-671.

Murphy PM. The Molecular Biology of Leukocyte Chemoattractant Receptors. *Annual Review of Immunology* 1994; 12:593-633.

Murray LA, Syed F, Li L, Griswold DE, Das AM. Role of chemokines in severe asthma. *Curr Drug Targets* 2006; 7:579-588.

- Negreiros B, Ungier C. *Alergologia Clínica*. Editora Atheneu; 1995.
- O'Byrne PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 27-32, suplement 2.
- O'Byrne PM, Inman MD, Parameswaran K. The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:503-8
- Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin Induces a Rapid Release of Eosinophils and Their Progenitors From the Bone Marrow. *Blood* 1998; 91:2240-2248.
- Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic Exercise Attenuates Airway Inflammatory Responses in a Mouse Model of Atopic Asthma. *The Journal of Immunology* 2004; 172:4520-4526.
- Pearce N, Douwes J. The global epidemiology of asthma in children. *Int J Tuberc Lung* 2006; 10:125-132.
- Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:305-318.
- Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M. Cross-Talk Between Constitutive and Inducible NO Synthase: Na Update. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; 8:949-954.
- Petrolani M, Lefort J, Vargaftig BB. Active immunization induces lung hyperresponsiveness in the guinea pig. Pharmacologic modulation and triggering role of the booster injection. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:1572-1578.
- Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol*. 1996; 118(6): 1433–1440.
- Pierre d'Almeida Telles Filho. <http://www.asma-bronquica.com.br>. 2007. (arquivo capturado em junho de 2007)
- Ponath PD, Qin S, Post TW. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med*; 1996. 183(6):2437–2448.

Powell WS, Ahmed S, Gravel S, Rokach J. Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:272-278.

Prussin C; Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S450-456.

Renz H., Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irbin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:1127-1138.

Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1994. p.583-584.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1303-10.

Rothenberg ME et al. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J. Exp. Med.* 1997; 185:785-790.

Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338:1592-1600.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:147-174.

Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992; 79(12):3101-9.

Sanjar S, Aoki S, Kristersson A, Smith D, Morley J. Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br J Pharmacol* 1990; 99(4):679-86.

Sato E, Simpson KL, Grisha MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. *Am J Pathol* 1999; 155:591-598.

Sato E, Simpson KL, Grisha MB, Koyama S, Robbins RA. Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8- induced neutrophil chemotactic activity in vitro. *J Biol Chem* 2000; 275:10826-10830.

Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer PR. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among Il-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol* 2000; 164:3847-3854.

Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:277-288.

Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res* 2000; 49:639-54.

Tachimoto H, Ebisawa M, Bochner BS. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128 Suppl 1:18-20.

Ten Broeke R, de Crom R, van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, van Ark I, de Clerck F, Nijkamp FP, Folkerts G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. *Respiratory Research* 2006; 7:58.

Teran LM. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today* 2000; 21(5):235-42.

Tateno H, Nakamura H, Minematsu N, Nakajima T, Takahashi S, Nakamura M, Fukunaga K, Asano K, Lilly CM, Yamaguchi K. Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Respir Med* 2004; 98(8):782-90.

The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998; 12:315-335.

Thomassen MJ, Raychaudhuri B, Dweik RA, Farver C, Buhrow L, Malur A, Connors MJ, Drazba J, Hammel J, Erzurum SC, Kavuru M. Nitric oxide regulation of asthmatic airway inflammation with segmental allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1174-1182.

Thomazzi SM, Ferreira HHA, Conran N, De Nucci G, Antunes E. Role of nitric oxide on in vitro human eosinophil migration. *Biochemical Pharmacology* 2001; 62:1417-1421.

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

Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1269-1289.

Tulic MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors in an in vivo allergic rat model. *Eur Respir J* 2000; 15:870-877.

Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29 Suppl 1: 9-13.

Vianna EO, Garcia-Leme J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(3 Pt 1):809-14.

Ward MDM, Selgrade MJK. Animal models for protein respiratory sensitizers. *Methods* 2006; 41:80-90.

Wardlaw AJ, Walsh GM, Symon FA. Mechanisms of eosinophil and basophil migration. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94(6 Pt 2):1163-71.

Wardlaw AJ. The role of adhesion in eosinophil function. *Chem Immunol* 2000; 78:93-111.

Weller PE. Immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991; 324:1110.

Weller PE. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:85-90.

Whitehead GS, Walker JKL, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol* 2003; 285:L32-42.

Wood LJ, Inman MD, Denburg JA, O'Bbyrne PM. Allergen challenge increases cell traffic between bone marrow and lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(6):759-67.

Wooley MJ, Denburg A, Rllis R, Dahlback M, P'Obyrne PM. Allergen induced changes in bone marrow progenitors and airway responsiveness in dogs and the effect of inhaled budesonide on these parameters. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1994; 11:600-606.

World Health Organization. WHO factsheet 206: bronchial asthma. Available from: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en). 2004.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol* 1999; 162:445-452.

Yamamoto K, Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Kaizuka M, Okumura K. Eotaxin level in induced sputum is increased in patients with bronchial asthma and in smokers. *Respiration* 2003; 70(6):600-5.

Ying S et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27:3507-3516.

Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB. Eosinophil Chemotactic chemokines (Eotaxin, Eotaxin-2, RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C Chemokine Receptor 3 Expression in Bronchial Biopsies from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics. *The Journal of Immunology* 1999; 163:6321-6329.

Zanardo RC, Costa E, Ferreira HHA, Antunes E, Martins AR, Murad F, De Nucci G. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:14111-14114.

Zeidler MR, Kleeerup EC, Tashkin DP. Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 10:31-36.

Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111:227-42.

Zosky GR, Sly PD, Turner DJ. Mouse models of asthma: What physiological evidence are they based on? *Allergy Clin Immunol Int* 2006; 18:76-79.

Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2007; 37:973-988.